



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

ISABEL CRISTINA NEVES VITÓ
BARGUEÑO PINTO

AVALIAÇÃO DE NOVOS FIXADORES
EM ANATOMIA PATOLÓGICA



Universidade de Aveiro 2010

Departamento de Biologia

ISABEL CRISTINA NEVES VITÓ BARGUEÑO PINTO

Universidade de Aveiro

2010

Departamento de Biologia

AVALIAÇÃO DE NOVOS FIXADORES EM ANATOMIA PATOLÓGICA

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Ana Paula Soares Dias Ferreira, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedicatória

Para o meu pai (*in memoriam*)

o júri

Presidente

Helena Silva, Professora Auxiliar, Departamento de Biologia, UA

Vogais

Ana Paula Soares Dias Ferreira, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (orientadora)

Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação, Departamento de Biologia, UA, (co-orientadora)

Paula Maria Nunes Gonçalves da Silva, Técnica Superior Principal do IPATIMUP, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (arguente)

Palavras-chave Fixação, Anatomia Patológica, Ambiente, Saúde Pública, Histoquímica, Imunohistoquímica, Hematoxilina/Eosina, Finefix, Rcl2, Formaldeído

Resumo Os eventuais efeitos nocivos para a saúde do Formol levaram ao desenvolvimento de novos fixadores para sua substituição. O presente trabalho propõe-se testar 2 desses novos fixadores ambientalmente menos perigosos, em Anatomia Patológica.

Foram estudadas 63 amostras de tecidos, provenientes de 19 casos seguidos no hospital de S. João-Porto. sempre que possível foram estudados em cada caso fragmento de tecido normal e um fragmentos de tecido tumoral.

Foram estudadas amostras de recto, útero, endométrio, prostata, estômago, intestino delgado, cólon, rim, vesícula biliar, mama, partes moles e tireoide tendo o processamento histológico sido executado nos fixadores Formaldeído tamponado a 4%, Finefix e RCL2.

Após processamento, inclusão em parafina e corte, as amostras foram submetidas a técnicas de histoquímica (Hematoxilina Eosina, PAS, PAS Após digestase, Orceína e Tricrómio Especial) e técnicas de imunohistoquímica (Desmina,Vimentina, P53, RE, Caderina, MIB, PSA, Tireoglobulina,CAM5.2, AE1AE3),

Em termos de eficácia de actuação, os fixadores alcoolicos provocaram destruição tecidular, revelada principalmente pela técnica histoquímica PAS após digestase., e grande heterogeneidade (aferição da recuperação antigénica) em particular na imunocitoquímica. Estes resultados indicam que os novos fixadores apresentam limitações para aplicação de técnicas de histoquímica e imunocitoquímica, pelo que estudos adicionais de optimização são fundamentais para a sua introdução na rotina de laboratórios de Anatomia Patológica.

Keywords

Fixing Pathology, Environment, Public Health, Histochemistry, Immunohistochemistry, Hematoxylin/Eosin, Finefix, Rcl2, Formaldehyde

Abstrat

This study proposes to test new fasteners not as harmful to public health as Formaldehyde, and less environmentally hazardous, used in a laboratory of pathology.

We studied 57 tissue samples from 19 cases followed at the hospital of S. João-Porto. Whenever possible in each case were studied fragment of normal tissue and tumor tissue fragments..

We studied samples from the rectum, uterus, endometrium, prostate, stomach, small intestine, colon, kidney, gallbladder, breast, thyroid and soft tissue with the histological processing was performed on the fasteners 4% buffered formaldehyde, and Finefix RCL2.

After processing, embedded in paraffin and cut the samples were subjected to immunohistochemistry (Vimentin, P53, ER, Cadherin, MIB, PSA), histochemical techniques (Hematolinina Eosin, PAS, PAS after digestase, and Masson Orceine Special) In terms of effectiveness of action, the fasteners disclosed in particular in the IHC heterogeneity (measurement of antigen retrieval), caused tissue destruction, especially revealed by PAS histochemistry after digestase This results show that the fasteners have limitations for application in histoquemistry and immunohistochemistry.

Adicional studies must be performed for introduction in practice in a laboratory of pathology.

INDICE

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

I.INTRODUÇÃO	1
I.1. Fixação	2
I.2. Características de um fixador eficaz	4
I.3. Parâmetros determinantes para uma boa fixação	4
a) pH	4
b) temperatura	5
c) tamanho dos espécimes e penetração dos fixadores	5
d) tempo de fixação	6
I.4. Tipos de fixadores	7
a) Formaldeído	8
b) Glutaraldeído	9
c) Outros fixadores	10
c.1) agentes oxidantes: iões metálicos e complexos	11
c.2) solventes	12
c.3) fixadores alcoólicos	12
I.5. Fixadores e os desafios das tecnologias moleculares	13
I.6. Efeitos nocivos do formaldeído	14
II.OBJECTIVOS	18
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
III.1. Amostras	19
III.2 Métodos	21
III.2.1 Histoquímica	22
Tabela I - Histoquímica utilizada e respectiva especificidade	23
III.2.2 Imunohistoquímica	27
Tabela II - Imunohistoquímica utilizada e sua especificidade	30
III. 2.3 Avaliação microscópica	30

IV. RESULTADOS	32
IV.1. Procedimentos de fixação	32
IV.2. Histomorfologia	33
a) Hematoxilina-Eosina	33
b) Histoquímica	33
b.1. Tricrómio de Masson	33
b.2. PAS	34
b.3. PAS após diastase	34
b.4. Orceína	34
Tabela III - Resultados obtidos na Histoquímica	35
Fotografias - Fig. 2	36
Fotografias - Fig. 3	37
c) Imunohistoquímica	38
Tabela IV - Resultados obtidos na Imunohistoquímica	39
Tabela V - Comparação dos resultados obtidos na imunohistoquímica em tecidos fixados em formaldeído ou em finefix	40
Fotografias - Fig.4	41
Fotografias - Fig. 5	42
V. DISCUSSÃO	43
Perspectivas Futuras	48
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
VII WEBLOGRAFIA	55
VIII ANEXOS	57
A) Hematoxilina-Eosina	57
B) Tricrómio Especial	58
C) PAS e Após	60
D) Orceína	62
E) Protocolo Imunohistoquímica	64

Agradecimentos

Os principais agradecimentos de coração são para a minha amiga/orientadora Paula Soares por todo o apoio, amizade e paciência demonstrados; sei que tem uma agenda com muito pouca disponibilidade e também sei que não foi de todo fácil conseguir dar-me o apoio necessário. No entanto, consegui(mos) Paula!

Um especial agradecimento à Professora Doutora Fátima Carneiro, Directora do Serviço de Anatomia Patológica no Hospital de S. João, E.P.E., Porto, local onde exerço a minha actividade profissional, há alguns anos...A ela agradeço a autorização concedida para o desenvolvimento de todo o trabalho de investigação que levei a cabo, assim como toda a liberdade para utilizar os meios que entendi que me eram necessários.

Agradeço a todos os meus colegas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S. João pela colaboração e apoio prestado, nomeadamente na recolha das amostras, com um agradecimento especial às colegas que fazem rotação pelo sector de Imunohistoquímica, pois foram as mais solicitadas, com um especial agradecimento à colega/amiga Sandra Relvas, particularmente pela amizade demonstrada; agradeço também ao *nosso* "informático" Joel pelas "dicas" informáticas e pela sua disponibilidade.

Um especial agradecimento ao Dr. João Magalhães, patologista do Hospital de S. João pelo tempo (e todos nós sabemos como é precioso!) dispensado comigo, tanto na avaliação microscópica, como na execução das fotografias, assim como em todo o apoio prestado.

Um agradecimento de coração à amiga Fátima Magalhães pelo apoio prestado, sei como é solicitada!

Um último agradecimento, e não menos importante, à ZMway, por ter cedido gratuitamente o fixador RCL2 para a realização do presente estudo.

Lista de abreviaturas:

ACGIH - American Conference of Industrial Hygienists

AP - Anatomia Patológica

ATC- Anticorpo

ATG - Antigénio

EPA - Environmental Protection Agency

F -Formaldeído

FF - Finefix

HE - Hematoxilina/ Eosina

IARC -International Agency for Research on Cancer

NCI - Natural Câncer Institut

IHC - Imunohistoquímica

NOAEL - No Observed Adverse Effect Level

OMS - Organização Mundial de Saúde

OSHA- Occupational Safety and Health Administration

PPM/ ppm- partes por milhão

UFFI- Urea-Formaldehyde Foam Insulation

Lista de figuras:

Fig. 1 -Estrutura do formol e do gluteraldeído

Fig. 2 -Caso 17, Cortes de Rim. Coloração de HE, ampliação 400x: A- Formol; B- Finefix; C- RCL2; Coloração de PAS, ampliação 200x: D- Formol; E- Finefix; F- RCL2

Fig. 3 - Caso 17, Cortes de Rim. 1- Coloração HE,; 2- Coloração Tricrómio de Masson; 3- Coloração de PAS; 4- Coloração de PAS após digestase; A - FORMOL; B - FINEFIX; C - RCL2 Caso 19, Cortes de Cólon. 5- Coloração de Orceína.

(1- Ampliação 400x; 2, 3, 4 e 5- Ampliação 200x);.

Fig. 4 - Caso 20, Cortes de Cólon. Coloração por IHQ: MIB 1 (A e B); Vimentina (C e D); A e C - FORMOL; B e D - FINEFIX; Ampliação: 400x (A); 200x (B, C e D)

Fig. 5 - Caso 21, Cortes de Pulmão. Coloração Cam5.2 por IHQ, ampliação 400x: A - Formol; B - Finefix; C- RCL2.

I-INTRODUÇÃO

Remontam a 400 AC as primeiras observações sobre os efeitos biológicos do mercúrio e do álcool como fixadores. Contudo, só depois da invenção do microscópio - que relatos históricos referem ter ocorrido em 1590, ainda que só a partir de 1650 se tenha verificado a publicação das respectivas observações - se tornou possível (re)conhecer a estrutura histológica dos tecidos. ⁽¹⁾. O estudo mais sistemático dos fixadores e da sua acção iniciou-se na segunda metade do séc. XIX. ⁽²⁾

A célula viva mantém-se num estado fluido ou semi-fluido. Uma vez removidos os tecidos do corpo humano inicia-se um processo de autólise imediatamente após a morte celular pela acção de enzimas intra-celulares, que causam o colapso das proteínas tecidulares e liquefacção da própria célula. A autólise é assim mais severa em tecidos ricos em enzimas tais como o fígado, encéfalo e rim, sendo mais lenta em tecidos ricos em fibras elásticas e em colagénio. Através da microscopia de luz, os tecidos autolisados apresentam uma aparência "lavada", com edema do citoplasma e, por vezes, aparência granular, sem qualquer afinidade para qualquer tipo de coloração. Nos núcleos das células autolisadas podem ser observadas algumas alterações idênticas às da necrose tecidular nomeadamente ao nível da morfologia nuclear: picnose (condensação), cariorréxis (fragmentação) e cariólise (lise), sem qualquer resposta tecidular ou inflamatória. Neste contexto, torna-se portanto necessário prevenir a deterioração dos tecidos durante todo o processamento histológico, o que é assegurado pela acção de fixadores. Para além de evitar o ataque bacteriano, a sua acção provoca modificações químicas das proteínas e

outras biomoléculas que promovem a preservação dos constituintes tecidulares.⁽³⁾

Em histopatologia, a maior parte das técnicas laboratoriais implicam a fixação química dos tecidos previamente à observação ao microscópio. Existem no entanto algumas técnicas histoquímicas em que a crio-fixação (fixação por métodos físicos) é o processo de eleição. É o caso de técnicas para quantificação da actividade de enzimas mitocondriais (NADH, FAD, ATP, COX, SDH) que se realizam em centros especializados no diagnóstico de miopatias, e não constituem técnicas de rotina, não sendo por isso desenvolvidas neste trabalho.

I.1. Fixação

A fixação (assim como o processamento) é um procedimento usado para capturar ou "fixar", num determinado momento, relações entre as células, os componentes celulares (ex: membranas celulares, nucléolo) e os componentes extra-celulares (ex: colagénio).⁽⁴⁾

A fixação traduz-se na alteração do estado natural de uma molécula biológica por desnaturação. Especificamente, desnaturar uma macromolécula significa alterar a sua conformação. Uma vez alterada a conformação, a molécula é menos susceptível à degradação por enzimas endógenas e, como tal, não sofre proteólise.⁽⁵⁾

Deste modo, o objectivo da fixação é o de preservar amostras de material biológico (tecidos ou células) de modo a manter, o mais fielmente possível, as características *in vivo*. Dado serem raros os elementos celulares que possuem cor no espectro visível, é necessário após a fixação e processamento usar métodos de coloração, que permitam dar contraste às estruturas celulares

facilitando a sua identificação ou, no caso de colorações especiais, evidenciando componentes específicos (fibras, mucopolissacarídeos, proteínas, etc. ...). Os fixadores imobilizam as moléculas constituintes das células, quer por coagulação, quer por floculação (aglutinação de partículas formadas na coagulação que apresentam dificuldade de sedimentação por terem dimensões reduzidas e baixa densidade).

É importante que os tecidos sujeitos a fixação não sejam substancialmente alterados na forma ou no volume durante o procedimento, de modo a permitir a manutenção da sua morfologia (forma e estrutura). Para atingir estes objectivos, deverão atender-se os seguintes aspectos:

- um fixador usualmente actua por inactivação, em particular, de enzimas proteolíticas, as quais, de outro modo, digeririam ou danificariam a amostra;
- os fixadores protegem as amostras de sofrerem danos extrínsecos, uma vez que são tóxicos para a maioria dos microorganismos comuns (bactérias em particular); ⁽⁶⁾
- os fixadores alteram as células ou os tecidos ao nível molecular, aumentando a sua resistência mecânica ou estabilidade, o que preserva a morfologia de uma amostra quando processada para análises posteriores.

Mesmo a fixação mais cuidadosa altera a amostra e introduz artefactos que podem interferir com a interpretação da estrutura celular. Um exemplo curioso é o "mesossoma" bacteriano, identificado nos anos 70 como sendo um organelo existente em bactérias Gram-positivas. Contudo, foi posteriormente demonstrado, por técnicas entretanto desenvolvidas para microscopia electrónica, ser simplesmente um artefacto resultante do processo de fixação. ⁽⁷⁾

A composição química de um fixador deve assegurar a manutenção da estrutura dos diferentes tecidos e órgãos o mais próximo da realidade quanto possível. Na sua preparação deverão considerar-se, entre outros factores, o pH da solução, a sua tonicidade e ainda a presença de iões bivalentes e açúcares.

I.2. Características de um fixador eficaz:

Na fixação de tecidos para rotina histopatológica, a reacção mais importante para manter a morfologia é a que estabiliza as proteínas (em particular aquelas com actividade enzimática). Muitos fixadores possuem como característica formar reacções cruzadas (cross-links) entre as proteínas através da formação de um gel, conservando-as assim como se encontravam *in vivo*. As proteínas solúveis são fixadas a proteínas estruturais, ficando assim insolúveis e deste modo dão uma força mecânica à estrutura total, permitindo os passos subsequentes no processo de inclusão. ^(w1)

São também características importantes de um fixador ter bom poder de penetração e, conseqüentemente, rapidez de actuação; difundir-se pelas células não removendo ou arrastando constituintes das mesmas, tais como glícidos ou lipídeos; e ainda preparar o tecido de modo a não ser alterado pelos processos posteriores à fixação.

I.3. Parâmetros determinantes para uma boa fixação

a) pH

O pH parece ser um dos elementos mais importantes a ter em conta, pois os resultados obtidos com fixadores não tamponados são muito variáveis. Em geral, a concentração iónica do fixador deve ser equilibrada, pelo que se torna

indispensável a neutralização do fixador. O processo de morte celular é acompanhado por modificações de pH que podem alterar a afinidade a corantes e introduzir artefactos. É por isso indispensável que os fixadores tenham um grande poder tampão estabilizando a solução e permitindo que a fixação decorra a um pH fisiológico (7.2 - 7.5). ⁽⁸⁾

b) Temperatura

A fixação de fragmentos para microscopia óptica processa-se habitualmente à temperatura ambiente. No entanto, uma vez que as reacções químicas, incluindo as envolvidas na fixação, são mais rápidas a temperaturas mais altas, ⁽⁹⁾ alguns laboratórios utilizam processadores de tecidos em que a fixação ocorre à temperatura de 40°C durante aproximadamente 5 horas. No entanto, vários estudos mostram que temperaturas mais altas comprometem a qualidade das colorações imunohistoquímicas. ⁽¹⁰⁾

Alguns procedimentos histoquímicos e para ME devem decorrer entre 0 e 4°C. A esta baixa temperatura, não só a autólise como a difusão do fixador nos vários componentes celulares é mais lenta, permitindo assim uma aparência mais próxima da situação *in vivo*. Exceptuam-se alguns tipos celulares como os mastócitos, cuja fixação é melhor à temperatura ambiente, mesmo para microscopia electrónica.

c) Tamanho dos espécimes e penetração dos fixadores

A penetração dos fixadores nos tecidos é um processo relativamente lento. A fixação depende do coeficiente de difusibilidade do fixador e da maneira como reage com os componentes tecidulares. O coeficiente de difusibilidade corresponde à penetração do fixador no tecido durante uma hora (distância

medida em milímetros). Geralmente, quanto mais alto é o valor do coeficiente de difusibilidade mais eficaz é o fixador. ^(11,12)

De forma a garantir uma fixação satisfatória e uma difusibilidade mais eficaz, os fragmentos tecidulares têm que ser pequenos e finos; a espessura máxima não deverá ultrapassar os 2 a 4 mm e o tamanho nunca pode exceder a cassete onde é processado (como limite máximo). Em geral, o volume do fixador deve ser cerca de 10 vezes o volume do tecido. Peças maiores devem ter um período de pré-fixação pelo que têm que ser abertas, lavadas e colocadas imediatamente em fixador. ⁽¹³⁾

d) Tempo de fixação

Este parâmetro deverá ser variável em função do material a ser preservado, ou seja, a tecidos diferentes deverão corresponder tempos diferentes de fixação; tecidos mais friáveis como os gânglios linfáticos ou o tecido cerebral devem ter um período de fixação mais longo, ao passo que tecidos mais fibrosos exigem menos tempo de fixação. ⁽¹⁴⁾

Outro aspecto a considerar diz respeito ao tempo que medeia entre a remoção dos tecidos e a fixação, uma vez que ocorrem alterações bioquímicas significativas nos 10 minutos pós-anoxia. Com o objectivo de minimizar a degradação tanto dos ácidos nucleicos como das proteínas, aquele tempo deve ser reduzido ao mínimo, em particular nos tecidos com um alto nível de RNases e proteases, como o pâncreas, bexiga e pele.

Uma fixação inadequada pode ocorrer tanto por defeito como por excesso de tempo de fixação. No primeiro caso, pode verificar-se uma difusão insuficiente (havendo zonas dos fragmentos em que o fixador não penetrou, ou uma incompleta formação das reacções químicas próprias à sua acção). Por

outro lado, uma exposição prolongada ao fixador provoca artefactos pós-processamento que morfologicamente se traduzem em retracção nuclear e perda de definição dos organelos celulares. ^(W2)

Há evidência que uma fixação prolongada com aldeídos pode causar retracção e endurecimento dos tecidos, bem como inibição severa da actividade enzimática, conquanto a acção prolongada de fixadores oxidativos degrada os tecidos por clivagem oxidativa das proteínas e perda de peptídeos. ⁽¹⁵⁾

No sentido de prevenir estas consequências, e aparte as situações particulares descritas anteriormente, a prática comum é retirar fragmentos de espessura adequada (entre 2 e 4 mm) e colocá-los em formaldeído tamponado (10 vezes o volume do fragmento) entre 4 e 8 horas. Grandes peças e vísceras devem ser abertas e colocadas *overnight* em formaldeído tamponado (o já referido passo de pré-fixação). ⁽¹⁶⁾

I.4. Tipos de fixadores

O formaldeído é o fixador por excelência em microscopia óptica, sendo utilizado por rotina em laboratórios de AP em todo o mundo. O tetróxido de ósmio e o glutaraldeído são os fixadores mais utilizados em microscopia electrónica. Existem, no entanto, dezenas de fixadores e misturas de fixadores, alguns específicos para um procedimento em particular e outros mais universais, todos apresentando vantagens e desvantagens. Em seguida referiremos os que consideramos mais relevantes na prática actual da AP.

a) Formaldeído

O formaldeído é uma solução concentrada (40%) do gás formaldeído em água. Assim, a solução de formaldeído a 10%, utilizada por rotina em AP, representa a solução de um gás a 4%. ⁽¹⁸⁾

Em solução aquosa, o formaldeído reage espontaneamente com as moléculas de água originando metilenoglicol; estas reacções espontâneas levam à perda da principal molécula com acção fixadora, o formaldeído. Por este facto, as soluções comerciais têm na sua composição uma pequena percentagem de metanol, que evita a polimerização do metilenoglicol e, conseqüentemente, a hidratação do formaldeído. ⁽¹⁹⁾ Em laboratórios de histopatologia, a grande maioria das amostras é fixada numa solução aquosa de formaldeído que contém fosfato de sódio, usada para o tamponamento da solução.

A acção fixadora do formaldeído é devida à capacidade do seu grupo aldeído reagir espontaneamente com grupos reactivos de proteínas, formando pontes de metileno entre proteínas adjacentes (intermoleculares) ou dentro da mesma proteína (intramoleculares).

Esta reacção ocorre em duas etapas:

- reacção de adição
- formação de pontes de metileno

Através do estabelecimento das pontes de metileno, as pontes intracelulares solúveis ligam-se às proteínas estruturais, tornando-se insolúveis ^{(8) (19) (20)}

O formaldeído pára a degradação tecidular reagindo com os aminoácidos lisina, cisteína, arginina triptofano, histidina, e aminas N-terminais (aminoácido que existe no extremo de uma proteína ou polipéptido) formando aductos de metilol. ^{(21) (22)}

O formaldeído a 4% tamponado continua a ser o fixador por excelência e o que apresenta o melhor compromisso nas diversas circunstâncias: não é caro, o tecido pode manter-se durante longos períodos sem se deteriorar e é compatível com a maioria das colorações utilizadas por rotina em laboratórios de anatomia patológica. ⁽²³⁾

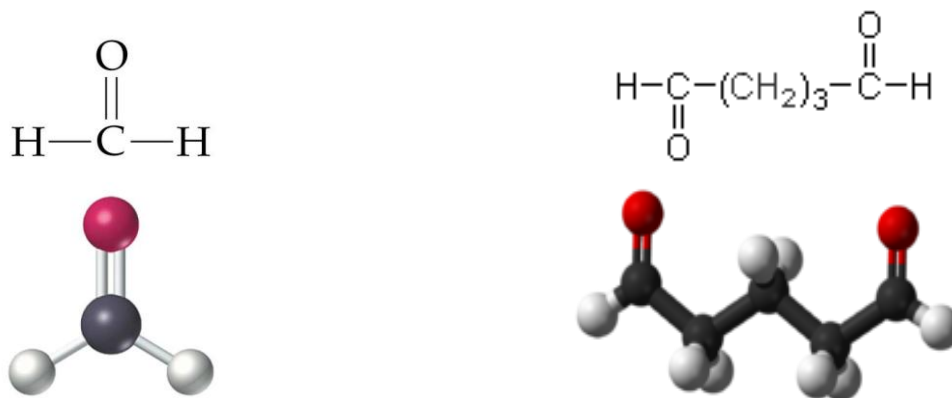


Figura 1 - Estrutura do formaldeído (HCHO) e do glutaraldeído (CHO-(CH₂)₃-CHO)

(fontes: <http://www.mindfiesta.com/formaldehyde>; http://www.kelien.com/products/GLUTARALDEHYDE_111-30-8.gif)

Existem várias misturas fixadoras baseadas em formaldeído que são utilizadas em situações específicas. Uma das mais populares é conhecida como **fixador de Bouin**, que consiste numa mistura de formaldeído com um fenol (ácido pícrico) e ácido acético glacial. Especialmente aconselhado para tecidos friáveis (endométrio, gânglios), deixa o tecido macio e revela bom poder de penetração por precipitação das proteínas. É no entanto desaconselhado para estudos moleculares.

b) Glutaraldeído

Uma solução aquosa de glutaraldeído (aldeído glutárico) é uma mistura complexa que consiste em aproximadamente 4% de aldeído livre, 16% aldeído monohidratado, 9% dihidratado e 70% hemiacetal (composto com características de álcool e éter). ⁽²⁴⁾ ⁽¹¹⁾

Como o formaldeído, o glutaraldeído é também um agente responsável por reacções cruzadas na fixação tecidular. Usando os seus grupos aldeído funcionais, o glutaraldeído reage primeiro com os grupos amino dos aminoácidos e dos ácidos nucleicos. ^{(8) (11)}

A química da fixação pelo glutaraldeído é complexa e pouco conhecida. Tal como o formaldeído, fixa as células porque se combina com os agrupamentos amínicos das proteínas. O glutaraldeído possui um agrupamento aldeídico em cada extremidade da molécula e possui a capacidade de estabelecer pontes entre as unidades proteicas, estabilizando assim a estrutura quaternária da proteína.

Quando a solução de glutaraldeído é mantida durante longos períodos à temperatura ambiente, há tendência para precipitar; como tal, existem muitas variações na sua preparação, que incluem percentagens variáveis de fixador ou junção de aditivos e tampões. ^{(8) (11)}

Comparando a actividade fixadora sobre os microtúbulos (constituídos por dímeros proteicos) entre o formaldeído e o glutaraldeído, verifica-se que este, como possui dois grupos aldeídos, pode ligar-se a dois dímeros proteicos, mantendo a estrutura do microtúbulo. O formaldeído é incapaz de manter essa estrutura, pois cada molécula de formaldeído tem apenas um agrupamento aldeído que se prende a um único dímero. No entanto, o glutaraldeído revela-se muito menos vantajoso como fixador de rotina em histopatologia, uma vez que endurece muito os tecidos, tem um poder de penetração lento e, além disso, é muito tóxico.

c) Outros fixadores

Não existem fixadores perfeitos, usando-se frequentemente misturas de fixadores de modo a minimizar as imperfeições de cada um. O fixador deve

ser escolhido em função das características do tecido, os exames pretendidos *a posteriori* e as colorações a aplicar.

c.1) Agentes oxidantes: iões metálicos e complexos

O **tetróxido de ósmio** é um fixador que contém iões metálicos; é muito usado como fixador secundário em ME. Forma reacções cruzadas com as proteínas e reage com lípidos insaturados formando compostos negros que contêm ósmio hexavalente. A fixação com o ósmio causa a completa desnaturação proteica.

Este fixador é usado para a preservação de pequenas estruturas em ME e é eficaz para pequenos fragmentos. Não é muito eficaz para microscopia de luz.

O **ácido crómico** é um oxidante forte que é usado com outros ingredientes. Difunde-se de forma lenta e, após a oxidação, pode ocorrer retracção tecidular durante o processamento. Não actua sobre as gorduras. Os sais de crómio formam complexos com a água que se combinam com grupos reactivos das proteínas adjacentes, provocando reacções cruzadas com efeito similar ao do formaldeído. Os produtos resultantes da oxidação do ácido crómico tendem a precipitar nos tecidos, ficando os cortes com precipitado negro de difícil remoção. ^{(8) (11)}

O **cloreto de mercúrio** é um fixador que penetra rapidamente e precipita as proteínas. A produção de iões de hidrogénio faz com que a solução fixadora fique mais ácida e os cristais de mercúrio depositam-se no tecido, necessitando ser removidos antes da coloração.

Zenker, Helly's, Ridley's e B5 constituem exemplos de fixadores com mercúrio na sua composição, que devido à sua elevada toxicidade estão em desuso ^(w3)

c.2) Solventes: Os solventes como a **acetona** alteram a estrutura terciária das proteínas por precipitação, através da quebra de pontes de hidrogénio e pela . Os lípidos das membranas e do citoplasma são dissolvidos e extraídos. A deslocação de água causa retracção celular destruindo a maior parte dos organelos da célula, originando por isso numerosos artefactos. ⁽²⁵⁾

c.3) Fixadores alcoólicos

Os álcoois são fixadores que actuam rapidamente mas produzem sempre algum efeito de endurecimento e retracção tecidular; actuam por coagulação das proteínas e colapsam os ácidos nucleicos que normalmente voltam ao seu tamanho inicial quando rehidratados. Não mascaram os locais de antigenicidade, pelo que não necessitam recuperação de epítopes induzida pelo calor, que é muitas vezes necessária no caso da fixação com formaldeído. ⁽²⁶⁾

O **metanol** e o **etanol** provocam a alteração da estrutura das proteínas devido ao rompimento das ligações hidrofóbicas, que contribuem para a manutenção da estrutura terciária das proteínas. As pontes de hidrogénio parecem manter-se mais estáveis em metanol ou etanol do que em água, porque, apesar de afectarem a estrutura terciária das proteínas preservam a estrutura secundária destas. Estes dois álcoois são os únicos que têm propriedades fixadoras.

O metanol está intimamente relacionado com a estrutura da água e compete, quase tão eficazmente quanto esta, por ligações de hidrogénio. O etanol também está relacionado com esta estrutura; ambos substituem moléculas de água nos tecidos durante a fixação. ⁽²⁶⁾

Em qualquer agente fixador a introdução de metanol e de ácido acético permite a preservação de espécimes maiores.

O aspecto do tecido é diferente se fixado em formaldeído ou neste tipo de fixadores; como a desidratação é simultânea à fixação, os protocolos de processamento podem ser mais curtos, permitindo um encurtamento no tempo total do processamento. ⁽²⁸⁾

I.5. Fixadores e os desafios das tecnologias moleculares

A fixação é usualmente a primeira etapa num processo faseado de preparação de uma amostra de material biológico para microscopia ou outras análises que se realizam em AP. O advento da patologia molecular generalizou a utilização de material fixado para estudos de alterações genéticas, correntemente utilizadas como auxiliares tanto no diagnóstico, como no estabelecimento do prognóstico e eventualmente na decisão terapêutica. Daí que, actualmente, um bom fixador tem de possuir uma qualidade adicional que é a de preservar a integridade dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). ⁽²⁹⁾ ⁽³⁰⁾

Estudos sobre as reacções químicas entre o formaldeído e os ácidos nucleicos demonstraram que várias reacções básicas são parecidas com aquelas observadas nas interacções formaldeído/proteínas. ⁽³¹⁾ O formaldeído inicia a desnaturação do DNA (rompe as ligações de hidrogénio e desemparelha as bases) na região AT da hélice do DNA criando locais para interacção química. ⁽³²⁾ Existem quatro interacções do formaldeído com o DNA:

- A primeira é uma reacção de adição: o formaldeído é adicionado à base de ácidos nucleicos para formar um grupo hidroximetil (entre 2 grupos aminometilol);
- A segunda é um "ataque" electrofílico de um N-metilol a uma base amino para formar uma ponte metileno entre 2 grupos amino;

- Na terceira, o tratamento com formaldeído pode gerar locais AP (apurínico e apirimidínico) via hidrólise dos locais N-glicosílico, deixando livre resíduos de pirimidinas e de purinas.

- Por fim, o formaldeído pode causar hidrólise lenta dos locais fosfodiester levando a cadeias curtas de polideoxiribose com pirimidinas intactas ⁽³²⁾

Estas interacções resultam em degradação parcial dos ácidos nucleicos (principalmente do RNA mas também do DNA), impossibilitando por vezes a obtenção de material com a qualidade mínima para técnicas moleculares como a PCR. Esta tem sido uma limitação importante na utilização de material fixado em estudos retrospectivos. ⁽³¹⁾

I.6 Efeitos nocivos do formaldeído

Em 1980, estudos mostraram que a exposição ao formaldeído pode causar cancro nasal em ratos. Esta constatação levantou a questão de saber se a exposição ao formaldeído também poderia causar cancro em humanos. Em 1987, a Agência de Protecção Ambiental (EPA) nos USA classificou o formaldeído como um provável carcinógeno humano em condições de exposição anormalmente elevada ou prolongada. ⁽³³⁾

Embora o tema continue em debate, desde aquela época que estudos levados a cabo com seres humanos expostos profissionalmente ao formaldeído sugerem que essa exposição está associada a certos tipos de cancro.

Diversos materiais possuem formaldeído na sua composição e podem libertar gases ou vapores na atmosfera. Os produtos de madeira prensada, contendo resinas feitas à base de formaldeído, são normalmente uma fonte deste

dentro das casas ⁽³³⁾. De acordo com um relatório elaborado em 1997 pelo U.S. Consumer Product Safety Commission (agência norte-americana encarregada de proteger o público em geral de riscos excessivos, morte ou lesões graves induzidas por vários tipos de produtos), o formaldeído encontra-se presente na natureza, normalmente a 0.03 ppm. Quando o formaldeído está presente no ar em níveis superiores a 0,1 ppm, alguns indivíduos podem apresentar efeitos adversos, tais como: olhos lacrimejantes, sensação de queimadura nos olhos, nariz e garganta, tosse, náuseas e irritação na pele.

Alguns profissionais de saúde, nomeadamente técnicos de laboratório, patologistas e pessoal auxiliar, são expostos a níveis mais altos de formaldeído que a população em geral. A exposição ocorre principalmente pela inalação do gás formaldeído ou através da pele, por absorção.⁽³⁴⁾ Estes profissionais têm que ter cuidados adicionais no seu manuseamento, ou seja: usar óculos de protecção, viseira, avental, luvas, máscara e, se possível, manusear o formaldeído numa hotte para produtos químicos.

Os efeitos a longo prazo da exposição ao formaldeído foram avaliados em estudos epidemiológicos tipo **coorte**¹ Foi recentemente concluída uma série deste tipo de estudos conduzidos pelo NCI em 1982, 1987 e 1995, que envolveram 25.619 trabalhadores de indústrias com potencial exposição ocupacional ao formaldeído. ⁽³⁴⁾ Os resultados não revelaram um aumento do risco de cancro da nasofaringe, sinusal ou pulmão. Relativamente a neoplasias linfo-hematopoiéticas e cerebrais, verificou-se um risco moderadamente elevado, mas provavelmente associado a outros cofactores.

(34)

¹ **Estudo de coorte:** estudo diacrónico que incide sobre um grupo de pessoas que possuem como característica comum a exposição a um determinado factor. A avaliação dos efeitos a essa exposição faz-se sempre por comparação com o **grupo-controlo**, em que se verifica a ausência de exposição do factor em estudo.

Um follow-up de 10 anos publicado em 2009 mostrou uma possível ligação entre a exposição a formaldeído e cancros do sistema hematopoiético e linfático, particularmente leucemia mielóide. ⁽³⁶⁾ (W5)

Dados experimentais indicam que, em ratos, a actividade cancerígena do formaldeído é associada a mecanismos citotóxicos/proliferativos. Sabendo que o valor de referência das directrizes de qualidade do ar da OMS para a Europa para o formaldeído é de 0,08 ppm (o equivalente a 0,1 mg), a transposição dos estudos laboratoriais para os humanos deverá conduzir à tomada de medidas que visem a protecção efectiva daqueles efeitos, tanto mais que a IARC classificou o formaldeído como um carcinogéneo humano.

Em Junho 2004, reuniu na sede da IARC um grupo de trabalho interdisciplinar com 26 cientistas de 10 países para a avaliação do risco cancerígeno de alguns produtos químicos para humanos. Esta foi a quarta avaliação da IARC sobre formaldeído. Cada reunião inclui uma revisão crítica sobre a literatura científica e uma avaliação de um potencial agente cancerígeno em humanos. Depois da discussão epidemiológica e experimental, o grupo de trabalho concluiu que o formaldeído é cancerígeno para os humanos, baseado em evidências em humanos e experiências em animais ⁽³⁶⁾

Dos estudos epidemiológicos do IARC concluiu-se haver evidência **suficiente** que o formaldeído causa cancro nasofaríngeo, evidência **forte mas não suficiente** como causa de leucemia e evidência **limitada** como causa de cancro sinonasal. ⁽³⁷⁾ ⁽³⁸⁾

Convém no entanto referir que apesar de estes estudos se referirem a níveis elevados de exposição, na maioria dos laboratórios de AP os níveis de formaldeído são, na actualidade, normalmente baixos, graças ao uso de sistemas de extracção e hottes. No entanto, os resultados destes estudos do

IACR, apesar de haver outros com resultados contraditórios ⁽³⁴⁾, foram já base para legislação em França e prevê-se que a breve prazo sejam também motivo de legislação na União Europeia, o que poderá implicar mudanças nas rotinas dos laboratórios de anatomia patológica.

Como consequência, têm surgido novas formulações de fixadores (tendo como base álcoois) e urge algum movimento de antecipação no teste destes produtos por parte daqueles que utilizam fixadores no seu dia-a-dia profissional.

II-Objectivos:

Com as novas regras que a breve prazo poderão ser eventualmente implementadas pela União Europeia relativamente ao manuseamento em laboratórios de químicos perigosos, surge a necessidade de adoptar reagentes substitutos. Torna-se assim imperioso a execução de testes prévios à sua adopção definitiva. Em Anatomia Patológica, o formaldeído constitui o exemplo mais flagrante, não só pela sua utilização quase exclusiva na fixação de tecidos mas também pelo potencial cancerígeno que o seu emprego continuado pode eventualmente acarretar.

Nesse sentido, é propósito deste trabalho testar o uso de dois substitutos do formaldeído - *Finefix* e *RCL2* - e compará-los com a fixação em formaldeído, nas vertentes Histológica, Histoquímica e Imunohistoquímica.

III-Material e Métodos

III.1 .Amostras:

De acordo com as regulamentações éticas em vigor em Portugal (Diário da República - I SÉRIE-A, nº 18 - Lei nº 12/2005, 26 de Janeiro), foram obtidos 57 fragmentos provenientes de 19 cirurgias efectuadas no Bloco Operatório do Hospital de S. João, Porto. Estas amostras tinham sido enviadas para o serviço de Anatomia Patológica para obtenção de um diagnóstico, o qual nunca ficou comprometido, pois para este estudo foram somente utilizados (com o consentimento da direcção do serviço) fragmentos de pequenas dimensões obtidos de material sobejante, após colheita de todo o material necessário ao diagnóstico. Os tecidos utilizados foram: recto (2 fragmentos de tecido normal e 3 fragmentos de tumor), útero (2 fragmentos de tecido normal), endométrio (2 fragmentos de tecido normal), próstata (2 fragmentos de tecido normal), estômago (5 fragmentos de tecido normal), rim (5 fragmentos de tecido normal e 3 fragmentos de tumor), tireoide (5 fragmentos de tecido normal e 5 fragmentos de tumor), mama (2 fragmentos de tecido normal), partes moles (2 fragmentos de tecido normal), vesícula biliar (5 fragmentos de tecido normal) e cólon (7 fragmentos de tecido normal e 7 fragmentos de tumor). Foram processados um total de 57 fragmentos, 15 de tumor e 42 de tecido adjacente normal.

Para garantir as mesmas condições de processamento histológico, todos os fragmentos retirados possuíam aproximadamente 3x2x1,5 mm de dimensões.

Sempre que possível, foram colhidos a fresco 3 fragmentos (gémeos) dos diferentes casos e imediatamente colocados em cada um dos fixadores (formaldeído, RCL2 e finefix). O tempo inicial de exposição - 24 horas - foi o mesmo para todos os fragmentos, período após o qual se seguiu o seu

processamento num processador automático de tecidos (Shandon Citadel 2000).

As amostras fixadas em formaldeído foram processadas automaticamente segundo o protocolo seguinte: 2 passagens de 1 hora cada em formaldeído (pós-fixação), 5 passagens de 1 hora cada em etanol absoluto (desidratação), 3 passagens de 1 hora cada em xilol (diafanização) e 2 passagens de 1 hora cada em parafina a 58° C (impregnação).

No caso das amostras fixadas em finefix, procedeu-se a uma passagem de 1 hora de pós-fixação em finefix, seguida por 5 passagens de 1 hora cada em etanol absoluto, 3 passagens de 1 hora cada em xilol e 2 passagens de 1 hora cada em parafina a 58° C.

As amostras fixadas em RCL2 foram sujeitas a uma pós-fixação (neste fixador) de 1 hora, seguida de 5 passagens de 1 hora cada em etanol absoluto, 3 passagens de 1 hora cada em xilol e 2 passagens de 1 hora cada em parafina. Todas as amostras foram, em seguida, incluídas em parafina (Histocentre 2: Shandon).

Na fase inicial da realização prática deste trabalho não foi possível utilizar o fixador RCL2, pois ainda não se encontrava disponível no distribuidor. Tal facto implicou que a nem toda a casuística - mas só em alguns casos - tenha sido aplicada este fixador. Assim, foram testados 25 fragmentos para formaldeído, 25 fragmentos para finefix e 7 fragmentos para RCL2.

III.2.Métodos

Preparação dos fixadores utilizados:

Formaldeído Neutro Tamponado (Merck): comercialmente é utilizado a 4% e já é adquirido diluído, pronto a utilizar.

Finefix (Milestone, Bergamo, Italy): solução concentrada; a solução de trabalho é preparada diluindo 720 cm³ de etanol a 100% com 280 cm³ de finefix .

Finefix é um fixador sem aldeídos na sua composição; ⁽³⁹⁾

Quando diluída em álcool a sua composição química, com aditivos de baixa toxicidade, supera os inconvenientes associados com o uso de etanol puro ou fixadores à base de etanol, nomeadamente a retracção tecidular, vacuolização e picnose nuclear. ⁽⁴⁰⁾

RCL2 (Alphelis-França): solução concentrada; a solução de trabalho é preparada diluindo 3 litros de RCL2 em 5 litros de etanol a 100%.

Sendo o RCL2 um fixador muito recente, os dados químicos e/ou bioquímicos não estão muito acessíveis. No entanto, dados veiculados pela patente revelam que é basicamente constituído por etanol a 70% com a adição de ácido acético e trealose. Este é um dissacarídeo encontrado na composição de insectos, fungos e plantas, cuja função principal é a de proteger estes organismos de desidratação. ⁽⁴¹⁾

Interessante sobre este fixador, é o facto de que as propriedades desidratantes desta mistura de álcool com ácido são possivelmente neutralizadas pela trealose, que, aparentemente, faz com que a mistura alcoólica seja funcional para preservar e, conseqüentemente, analisar, DNA e proteínas. ⁽⁴¹⁾ É um fixador comercial que, contendo ácido acético e etanol, faz uma boa preservação da histomorfologia e da integridade dos ácidos nucleicos em tumores da tireoide e da mama. ⁽⁴²⁾

Processamento e coloração de HE

Após a obtenção dos blocos de parafina foram efectuados cortes de 4 μ de espessura e realizadas técnicas de histoquímica e imunohistoquímica. Como "coloração base" foi efectuada a Hematoxilina-Eosina, técnica padrão para a observação da morfologia do tecido. A hematoxilina é um corante básico que reage com os componentes ácidos (ou basófilos) da célula (heterocromatina, nucléolo, RNA ribossómico, p. ex.) dando-lhes uma coloração azul. A eosina, por seu lado, é um corante ácido que reage com os componentes mais básicos (citoplasma, filamentos citoplasmáticos e fibras extracelulares) das células e tecidos, conferindo-lhe uma cor rosa (protocolo detalhado em **anexo A**).

III.2.1.Histoquímica

Para melhor compreensão, apresentam-se sob a forma de tabela (**Tabela I**) as técnicas de histoquímica seleccionadas para este trabalho seguindo-se nesta secção uma breve descrição dos princípios das técnicas. As descrições detalhadas das técnicas são apresentadas em Anexos.

As técnicas histoquímicas usadas foram seleccionadas tendo em conta, por um lado, o facto de serem técnicas frequentemente utilizadas em laboratórios de AP de rotina, e por outro lado, porque são bons indicadores de preservação de diferentes componentes celulares. Assim, foi utilizado o **Tricrómio de Masson** porque, sendo uma coloração tricrómica, constitui um bom marcador da eficiência da fixação em diversos componentes celulares e tecidulares. O **PAS** é um bom marcador de polissacarídeos neutros (sensíveis à fixação inicial e à rapidez desta) e a **Orceína** é um bom marcador de fibras elásticas (fibras em que a autólise se dá mais lentamente por serem ricas em colagénio, ao contrário de tecidos ricos em enzimas).

Tabela I: Histoquímica utilizada e respectiva especificidade

TÉCNICA	ESPECIFICIDADE MARCAÇÃO	ANEXO
Tricrómio de Masson	Colagénio, fibrina, tecido conjuntivo	B
Periodic Acid Schiff (PAS)	Mucopolissacarídeos neutros, colagénio	C
PAS após digestase	Mucopolissacarídeos neutros	C
Orceína	Fibras elásticas	D

As técnicas de histoquímica têm como finalidade evidenciar estruturas ou substâncias endógenas do tecido através das suas propriedades químicas. A histoquímica permite a interligação entre a morfologia e a composição/caracterização química de um tecido. Foram utilizados as técnicas **Tricrómio de Masson**, **PAS**, **PAS após digestase** e **Orceína**, cujos princípios referiremos em seguida. São colorações complementares utilizadas rotineiramente em histologia, pois sendo económicas permitem identificar componentes e estruturas de uma forma muito precisa.

O **Tricrómio de Masson** permite a visualização das fibras de colagénio, principal componente fibroso da substância intercelular, estando distribuídas por todo o organismo, excepto no sistema nervoso central, podendo aparecer como fibras individuais ou conjuntos de fibras.^(W7)

A demonstração das fibras de colagénio é útil para o diagnóstico diferencial de sarcomas (fibrosarcomas *versus* mioossarcomas) e para estudo de patologias hepáticas e pulmonares.

Nos tricrómios são utilizados três corantes: um corante básico nuclear e dois corantes ácidos, que coram selectivamente as fibras musculares e as fibras de colagénio.

O mecanismo geral das colorações tricrómicas não está muito bem elucidado. No entanto, existe consenso de que a coloração selectiva das estruturas carregadas positivamente (acidófilas) é devida ao facto de os corantes ácidos utilizados apresentarem tamanhos moleculares diferentes. Assim, se a matriz de um dado componente é muito densa, pouco "porosa", o corante ácido de menor tamanho molecular penetra e difunde rapidamente comparativamente ao corante ácido de tamanho molecular maior. Deste modo, um corante cuja molécula é pequena cora rapidamente todos os componentes densos, conquanto um corante com um tamanho molecular maior apresenta baixas taxas de penetração e de difusão nas estruturas mais densas, corando facilmente as estruturas mais laxas.

Neste método, as estruturas acidófilas do tecido são coradas, inicialmente, com um corante aniónico de tamanho molecular médio, a fucsina-ponceau. Este corante é removido dos componentes menos densos pelo ácido fosfomolibdico, isto é, este compete com a fucsina pelos sítios de ligação catiónicos presentes nas estruturas laxas, sendo capaz de deslocar a fucsina e de se ligar aos sítios catiónicos. Posteriormente, as estruturas mais laxas do tecido (colagénio) são coradas pelo corante de tamanho molecular superior, o azul de anilina ⁽⁴³⁾ (protocolo detalhado em **anexo B**).

PAS e Após Digestase

Um dos métodos mais difundidos para a visualização de glicogénio nos tecidos é a técnica do **Ácido Periódico de Schiff** (Periodic Acid Schiff; PAS). O glicogénio é um homoglicano (carbohidrato polissacarídeo) e a principal forma de armazenamento de energia de mobilização rápida nos mamíferos, sendo encontrado principalmente no fígado, no músculo-esquelético e cardíaco. Deficiências enzimáticas hereditárias, nomeadamente de algumas das enzimas que intervêm no metabolismo do glicogénio, levam à acumulação excessiva de glicogénio nos tecidos e a distúrbios metabólicos graves, as glicogenoses, como por exemplo a doença de Van Gierke e a doença de Pompe. Noutras patologias, como na diabetes Mellitus e situações que levam à esteatose hepática, há uma diminuição acentuada do glicogénio no citoplasma dos hepatócitos. ^(W8)

O princípio da coloração PAS baseia-se na capacidade do ácido periódico clivar por oxidação a ligação simples entre os carbonos dos grupos 1,2-glicol em grupos dialdeído reactivos, e do reagente de Schiff reagir com os grupos aldeídos recém-formados, levando à formação de um composto de adição com uma cor magenta. O aparecimento da cor é devido ao reaparecimento do grupo cromóforo. ⁽⁴⁴⁾

O método PAS não é, contudo, específico para a detecção do glicogénio; evidencia também polissacarídeos neutros, mucinas neutras, algumas mucinas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas epiteliais) e glicolípidos. Desta forma, são visualizadas todas as estruturas que apresentam na sua constituição glicoconjugados maioritariamente neutros, como por exemplo as membranas basais, as fibras elásticas jovens e as paredes dos fungos. ⁽⁴⁵⁾

É possível, contudo, avaliar especificamente a presença/ausência do glicogénio pelo PAS quando este método é realizado em dois cortes seriados, sendo um

tratado previamente com uma enzima que digere o glicogénio. A presença de glicogénio no tecido é detectada por comparação, ou seja, quando numa dada localização o corte não tratado apresenta marcação (cor) e o corte tratado não apresenta marcação (incolor) podemos concluir pela presença de glicogénio.

Na digestão do glicogénio *in vitro* é normalmente utilizada uma diastase extraída do malte que contém a α -amilase e a β -amilase. No entanto, podem ser utilizadas as amilases salivares (ptialina) para a digestão do glicogénio. ^(W9) Neste trabalho, um dos cortes foi tratado com a α -amilase, enquanto o outro foi incubado na solução tampão da enzima. Durante a incubação, a α -amilase cliva as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) das cadeias lineares e ramificadas do glicogénio havendo a libertação de unidades de glicose que, por serem hidrossolúveis, são facilmente removidas do corte após a digestão, por lavagem em água destilada. ^(W10)

Após o tratamento enzimático é realizada a técnica do PAS (protocolo detalhado em **anexo C**).

Orceína

As fibras elásticas são um dos componentes do tecido conjuntivo. Este tipo de fibras está distribuído por todo o organismo principalmente nas estruturas dos sistemas circulatório e respiratório.

A demonstração das fibras elásticas em cortes de tecido é principalmente utilizada no estudo de doenças pulmonares crónicas, na avaliação de lesões degenerativas congénitas ou adquiridas e no diagnóstico de elastoses. ^(W11)

Uma das colorações que permite visualizar as fibras elásticas é o método da Orceína. Neste método é utilizado um corante vegetal, a orceína, que em

solução alcoólica ácida cora especificamente as fibras elásticas de castanho-escuro. O mecanismo de coloração das fibras elásticas pela solução corante não está suficientemente elucidado. (W¹²)

Neste trabalho foi realizada uma variante do método original da Orceína, descrita por Shikata *et al*, que utiliza o verde luz como contrastante citoplasmático (protocolo detalhado em **anexo D**).

III.2.2.IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica de imunohistoquímica permite identificar constituintes celulares ou tecidulares - antigénios de uma forma muito específica, através da interacção antigénio (atg) - anticorpo (atc). O local da ligação atg-atc é identificado quer por marcação directa deste último quer por métodos indirectos, através dos quais a marcação é feita recorrendo a compostos secundários, resultando numa amplificação do sinal e permitindo uma melhor visualização microscópica.

Dependendo do tipo de tecido em estudo, foram seleccionados os marcadores imunohistoquímicos mais usados para determinação de linhagem histológica (epitelial ou conjuntiva) e marcadores com relevância diagnóstica. Por exemplo, em tecidos epiteliais usaram-se citoqueratinas e a E-caderina, em tireoide a tireoglobulina e em próstata o PSA. Na Tabela II estão sumariados os anticorpos utilizados, os pré-tratamentos e as diluições utilizadas para cada um.

Uma breve descrição da especificidade de cada anticorpo é dada de seguida:

Vimentina: antigénio expresso tipicamente em células mesenquimatosas, nomeadamente em células endoteliais, fibroblastos, células do tecido muscular liso e células linfóides. Alguns tumores co-expressam vimentina e

citoqueratina, como por exemplo: carcinomas da tireoide, adenomas pleomórficos das glândulas salivares, carcinomas do ovário e alguns carcinomas renais. A co-expressão de desmina e vimentina foi referenciada em tumores das partes moles, como rabdomiosarcomas e leiomiosarcomas.

Desmina: um anticorpo monoclonal utilizado na identificação de células da linhagem muscular. Este filamento intermediário é encontrado no músculo liso, estriado e cardíaco adulto. ⁽⁴⁷⁾

Caderina-E: proteína de adesão expressa em células normais de linhagem epitelial e em muitos tipos de neoplasias como carcinomas do pulmão, do tracto gastro-intestinal e do ovário. Usa-se também para distinguir adenocarcinomas de mesoteliomas. ⁽⁴⁸⁾

CAM5.2: as citoqueratinas são cadeias de polipeptídeos que formam proteínas estruturais dentro do citoesqueleto da célula epitelial; como algumas combinações específicas de peptídeos de citoqueratina estão associadas a diferentes células epiteliais, estes peptídeos são marcadores para a classificação dos carcinomas (tumores de origem epitelial) e para a distinção entre carcinomas e tumores malignos de origem não epitelial, tais como os linfomas, melanomas e sarcomas. ^(W13)

AE1/AE3: cocktail de dois anticorpos (AE1 e AE3), ambos reconhecendo sub-grupos de queratina. O AE1 reage com queratina de peso molecular baixo a intermédio na sub família ácida, enquanto o AE3 reage com a queratina também de peso molecular baixo a intermédio na sub família básica. O ab AE1/AE3 reconhece polipeptidos de queratina em quase todo o tipo de epiteliais; como tal é útil na diferenciação entre carcinomas (neoplasias de origem epitelial) e linfomas ou sarcomas (neoplasia de origem não epitelial). ^(W14)

Anti-Ki 67: anticorpo que reconhece um epíteto antigénico nuclear expresso em células em ciclo celular. A coloração pelo Ki-67 é utilizada para avaliar a actividade proliferativa quer em tecido normal quer em neoplásico. ^(W15)

PSA: antigénio presente no tecido prostático normal e na maioria dos carcinomas da próstata. Este anticorpo reconhece neoplasias prostáticas e metastáticas, mas raramente é expresso em tumores de origem não prostática. O PSA localiza-se no citoplasma das células acinares e ductais do tecido prostático normal e maligno. ^(W16)

Proteína p53: é uma molécula importante no controle do ciclo celular e da estabilidade genética, que se encontra muito frequentemente mutada e sobre expressa em cancro. O anticorpo monoclonal dirigido contra a proteína p53 (clone Bp-53-11) pode ser usado para ajudar na identificação de proliferação anormal em populações de células neoplásicas. ^(W17)

Anti-tireoglobulina: anticorpo que reconhece especificamente a macromolécula tireoglobulina, produzida pelas células foliculares da tireoide. Esta macromolécula é precursora das hormonas tiroideias, sendo sintetizada pelos tirócitos e transportada para a superfície apical onde é secretada para o lúmen dos folículos tireoideus e armazenada como principal constituinte do colóide.

Receptor de estrogénios (RE): refere-se a um grupo de receptores que são activados pela hormona 17 β -estradiol (estrogénio). Existem dois tipos de receptores de estrogénio: ER, que é membro das hormonas nucleares família dos receptores intracelulares de estrogénio e o da proteína G- acoplado, GPR30 (GPER), que é um receptor acoplado à proteína G- .

A principal função do receptor de estrogénio é como um DNA-binding factor de transcrição que regula a expressão génica. No entanto, o receptor de estrogénio tem funções adicionais independentemente da ligação ao DNA.

Este anticorpo cora fortemente o núcleo das células epiteliais nos carcinomas da mama; é um importante regulador do crescimento e da diferenciação na glândula mamária. A sua presença nos tumores da mama indica uma maior probabilidade de ocorrer uma resposta à terapia anti-estrogénio.

Tabela II -Imunohistoquímica utilizada e sua especificidade.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	PRÉ-TRATAMENTO	ESPECIFICIDADE	CLONE/MARCA	ANEXO
			MARCAÇÃO		
Vimentina	1:800	microondas(calor)	Células endoteliais, músculo liso	Vq(3)/Zymed	E
Desmina	1:100	microondas(calor)	Músculo estriado	D33/Dako	E
Caderina-E	1:80	microondas(calor)	Moléculas de adesão	4A2C7/Zymed	E
AE1/AE3	1:50	Pepsina (enzimático)	Células epiteliais	AE1AE3/Zymed	E
Ki67	1:400	microondas(calor)	Células em Proliferação	MM1/Novocastra	E
PSA	1:300	microondas(calor)	Próstata	ER-PM8/Dako	E
			(antígeno específico)		
CAM 5.2	1:80	Pepsina (enzimático)	Células epiteliais	CAM5.2/becton-dick.	E
p53	1:100	microondas(calor)	Proliferação celular, danos no DNA	DO7/Dako	E
Tireoglobulina	1:50	microondas(calor)	Céls. foliculares da tireoide	DAK-Tg6/Dako	E
RE	1/300	microondas(calor)	Núcleo das células epiteliais nos carcinoma da mama	SP1/Neomarkers	E

III 2.3 Avaliação microscópica

A avaliação microscópica foi realizada por dois observadores independentes, tendo sido usada na avaliação uma escala de 0 a 3, sendo 0 a ausência total de coloração com perda geral da morfologia; "1" coloração pouco intensa, pouca diferenciação e má morfologia; "2" coloração de intensidade moderada mas

inferior à intensidade de marcação com formaldeído, diferenciação média e morfologia inconsistente; e "3" coloração intensa, boa diferenciação e boa morfologia.

IV. Resultados

IV.1. Procedimentos de fixação

Durante o estudo foram recolhidos 57 fragmentos de 19 casos tendo sido possível recolher amostras em número igual para formaldeído e finefix (25 amostras para cada fixador) e em menor número para o fixador RCL2 (7 amostras), pelos motivos atrás explicitados.

O tempo de fixação médio para cada um dos fixadores foi de 24 horas com a excepção de 3 casos que fixaram (1ª fixação) durante 72 horas. A nível macroscópico, nos fixadores alcoólicos, observaram-se algumas diferenças relativamente ao formaldeído, nestes tecidos com tempo de fixação mais prolongado (72 horas); embora a fixação implique sempre alguma retracção e dureza tecidular, para este intervalo de tempo, a dureza e a retracção foram superiores nos tecidos em fixadores alcoólicos do que nos tecidos fixados em formaldeído. Para um tempo de fixação de 24 horas as diferenças, a este nível, não são significativas.

O tempo que decorreu entre a cirurgia e a fixação foi controlado em quase todos os casos; média de 1 hora entre a cirurgia e a colocação em fixador excepto em 8 casos que tiveram só 30 minutos entre a colheita e a fixação (de referir que quase todos estes casos têm que ser devidamente preparados para serem colocados no fixador ou seja, abertos -se for o caso- limpos, seccionados para maior exposição a este, eventualmente pintados para melhor visualização microscópica). Apesar de 1 hora de intervalo entre a cirurgia e a fixação não ser o ideal, pois favorece a autólise, deve referir-se que na prática é muito difícil diminuir este tempo devido a dificuldades em conciliar a logística do bloco operatório com a do laboratório de AP. Apesar de tudo não se verificaram grandes variações associadas a estes parâmetros.

IV.2. Histomorfologia

a) Hematoxilina-Eosina

A coloração pela Hematoxilina-Eosina permite a observação microscópica da morfologia dos tecidos e das células, sendo possível detectar alterações a nível da arquitectura tecidular e da morfologia celular.

Os fixadores utilizados podem levar a alterações da arquitectura/morfologia dos tecidos e das suas características tintoriais, o que pode dificultar o diagnóstico anatomopatológico.

Em relação a este estudo utilizaram-se vários parâmetros para avaliar a histomorfologia (detalhes nucleares e citoplasmáticos e morfologia em geral) e as características tintoriais dos tecidos (intensidade da coloração nuclear e citoplasmática). O HE mostrou para todas as amostras uma boa morfologia tecidular, idêntica em todos os fixadores, sendo a intensidade de coloração (nuclear e citoplasmática) mais marcada nos fixadores alcoólicos do que no formaldeído, independentemente do tempo de fixação (*Figura 2*).

b) Histoquímica

b.1) Tricrómio de Masson

Nesta técnica, na comparação com os dois tipos de fixadores, foram detectadas diferenças visíveis no tecido conjuntivo (particularmente nas fibras de colagénio) e na preservação da fibrina. O formaldeído, com o protocolo perfeitamente optimizado, foi avaliado com classificação de 2 e 3; o RCL2 obteve resultados com variações também entre 2 e 3, semelhantes às do formaldeído. Os resultados mais instáveis foram os obtidos com as amostras fixadas em finefix: os resultados variam entre o 1 e o 3 (de referir que o protocolo utilizado foi o mesmo para todos os casos e para todos os fixadores, tendo sido executado pelo mesmo operador), sendo as diferenças mais visíveis

ao nível do tecido conjuntivo (as fibras de colagénio coram em excesso não se visualizando a diferenciação tecidular) (*Figura 3.2*).

b.2) PAS

Neste estudo observamos não haver diferenças muito significativas nos vários fixadores, em relação a esta coloração (*Figura 3.3*).

As classificações no formaldeído (técnica optimizada), no finefix e no RCL2 são quase sobreponíveis, variando entre o 2 e o 3.

b.3) PAS após diastase

Nesta histoquímica os resultados nos fixadores alcoólicos não foram concordantes com os resultados do formaldeído: a avaliação dos fragmentos fixados em finefix e RCL2 variou entre o 0 (maior parte dos resultados) e o valor 1. Detectou-se também destruição da arquitectura tecidular (*Figura 3.4*).

b.4) Orceína

Neste estudo foram avaliados principalmente dois parâmetros nesta histoquímica: integridade das fibras elásticas (boa visualização em pormenor do recorte da fibra nos vasos), e correcta coloração de fundo.

Nesta coloração e em todos os fixadores testados, observa-se boa marcação das fibras sem diferenças que possamos classificar como significativas (*Figura 3.5*).

Tabela III: Resultados obtidos na histoquímica

Casos	Topografia	Cirurgia	Fixação	Fixação	Processamento	HISTOQUÍMICA				
						HE	TE	PAS	PAS-A	Orceína
Caso 1	RECTO (N)	11H	12,3H	72H	FORMOL	2	3	3	3	3
Caso 1	RECTO (N)	11H	12,3H	72H	FINEFIX	2	3	2	1	3
Caso 1	RECTO (T)	11H	12,3H	72H	FORMOL	3	3	3	3	3
Caso 1	RECTO (T)	11H	12,3H	72H	FINEFIX	3	3	3	1	3
Caso 2	ÚTERO	10H	11H	72H	FORMOL	3	2	2	3	1
Caso 2	ÚTERO	10H	11H	72H	FINEFIX	3	3	0	0	2
Caso 3	ENDOMÉTRIO	10H	11H	72H	FORMOL	3	2	2	3	2
Caso 3	ENDOMÉTRIO	10H	11H	72H	FINEFIX	3	3	0	0	3
Caso 4	PROSTATA	11H	12H	24H	FORMOL	3	2	2	2	2
Caso 4	PROSTATA	11H	12H	24H	FINEFIX	3	2	2	0	1
Caso 5	ESTOMAGO	11H	12H	24H	FORMOL	3	2	2	3	3
Caso 5	ESTÔMAGO	11H	12H	24H	FINEFIX	3	2	3	1	3
Caso 6	INT. DELG + EST.	10H	11H	24H	FORMOL	2	2	3	3	1
Caso 6	INT. DELG + EST.	10H	11H	24H	FINEFIX	3	1	3	0	2
Caso 7	CÓLON	11H	12H	24H	FORMOL	3	3	3	3	3
Caso 7	CÓLON	11H	12H	24H	FINEFIX	3	2	2	0	3
Caso 8	RIM	12H	12,3H	24H	FORMOL	3	2	3	3	2
Caso 8	RIM	12H	12,3H	24H	FINEFIX	3	2	3	0	1
Caso 9	VESÍCULA	11H	12H	24H	FORMOL	2	2	3	2	2
Caso 9	VESÍCULA	11H	12H	24H	FINEFIX	3	1	2	0	2
Caso 10	CÓLON N	10H	11H	24H	FORMOL	3	3	3	3	2
Caso 10	CÓLON T	10H	11H	24H	FORMOL	1	3	3	3	2
Caso 10	CÓLON N	10H	11H	24H	FINEFIX	2	2	3	1	3
Caso 10	CÓLON T	10H	11H	24H	FINEFIX	2	2	2	1	2
Caso 11	MAMA	10H	11H	24H	FORMOL	3	2	3	3	2
Caso 11	MAMA	10H	11H	24H	FINEFIX	2	2	3	0	3
Caso 12	PARTES MOLES	11H	12H	24H	FORMOL	2	3	2	3	3
Caso 12	PARTES MOLES	11H	12H	24H	FINEFIX	2	1	2	0	3
Caso 13	CÓLON	11H	12H	24H	FORMOL	2	2	2	2	3
Caso 13	CÓLON	11H	12H	24H	FINEFIX	3	3	3	1	3
Caso 14	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FORMOL	2+	3	3	2	3
Caso 14	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FORMOL	3-	3	3	3	2
Caso 14	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FINEFIX	2	2	2	0	3
Caso 14	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FINEFIX	2	1	2	0	3
Caso 15	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FORMOL	2	2	2	3	3
Caso 15	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FORMOL	3	3	3	3	2
Caso 15	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FINEFIX	3	2	3	1	3
Caso 15	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FINEFIX	3	2	2	1	2
Caso 15	TIREOIDE N	10H	11H	24H	RCL2	3	3	3	1	3
Caso 15	TIREOIDE T	10H	11H	24H	RCL2	3	3	3	1	2
Caso 16	ESTOMAGO	12H	12,3H	24H	FORMOL	3	2	2	2	3
Caso 16	ESTOMAGO	12H	12,3H	24H	FINEFIX	3	2	2	0	3
Caso 17	RIM N	10H	11H	24H	FORMOL	3	3	3	3	2
Caso 17	RIM T	10H	11H	24H	FORMOL	3	2	3	3	2
Caso 17	RIM N	10H	11H	24H	FINEFIX	3	2	3	1	3
Caso 17	RIM T	10H	11H	24H	FINEFIX	3	2	2	1	2
Caso 17	RIM N	10H	11H	24H	RCL2	3	3	3	3	3
Caso 17	RIM T	10H	11H	24H	RCL2	3	2	2	2	3
Caso 18	VESÍCULA BILIAR	11H	12H	24H	FORMOL	3	2	3	3	2
Caso 18	VESÍCULA BILIAR	11H	12H	24H	FINEFIX	3	2	3	0	2
Caso 18	VESÍCULA BILIAR	11H	12H	24H	RCL2	3	2	3	2	3
Caso 19	CÓLON N	11H	12H	24H	FORMOL	3	3	3	3	3
Caso 19	CÓLON T	11H	12H	24H	FORMOL	3	3	3	3	3
Caso 19	CÓLON N	11H	12H	24H	FINEFIX	3	2	2	1	1
Caso 19	CÓLON T	11H	12H	24H	FINEFIX	3	2	2	1	3
Caso 19	CÓLON N	11H	12H	24H	RCL2	3	3	3	3	3
Caso 19	CÓLON T	11H	12H	24H	RCL2	3	3	3	3	3

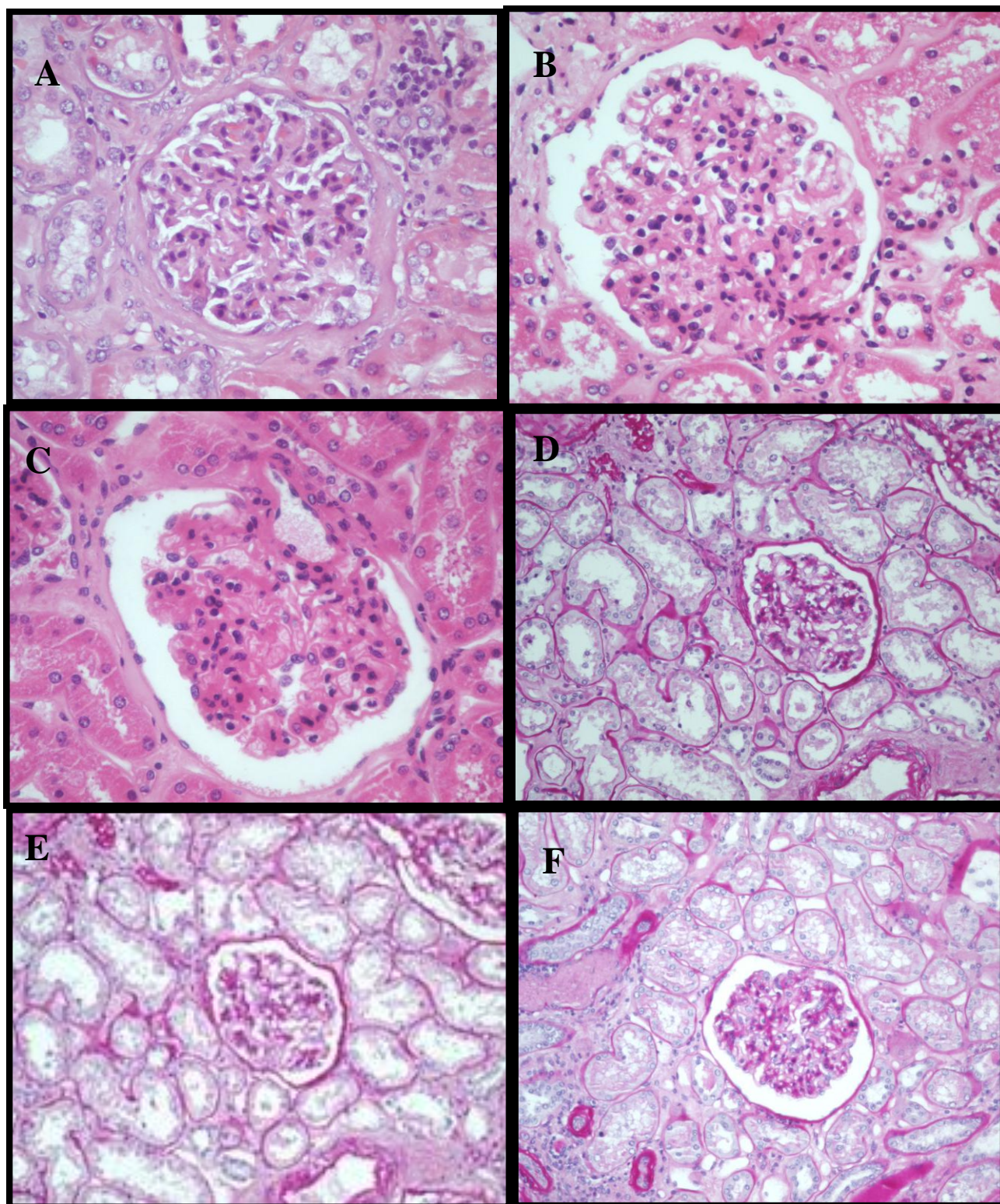


Figura 2 - Caso 17, Cortes de Rim. Coloração de HE, ampliação 400x:

A– Formol; B– Finefix; C– RCL2;

Coloração de PAS, ampliação 200x: **D– Formol; E– Finefix; F– RCL2**

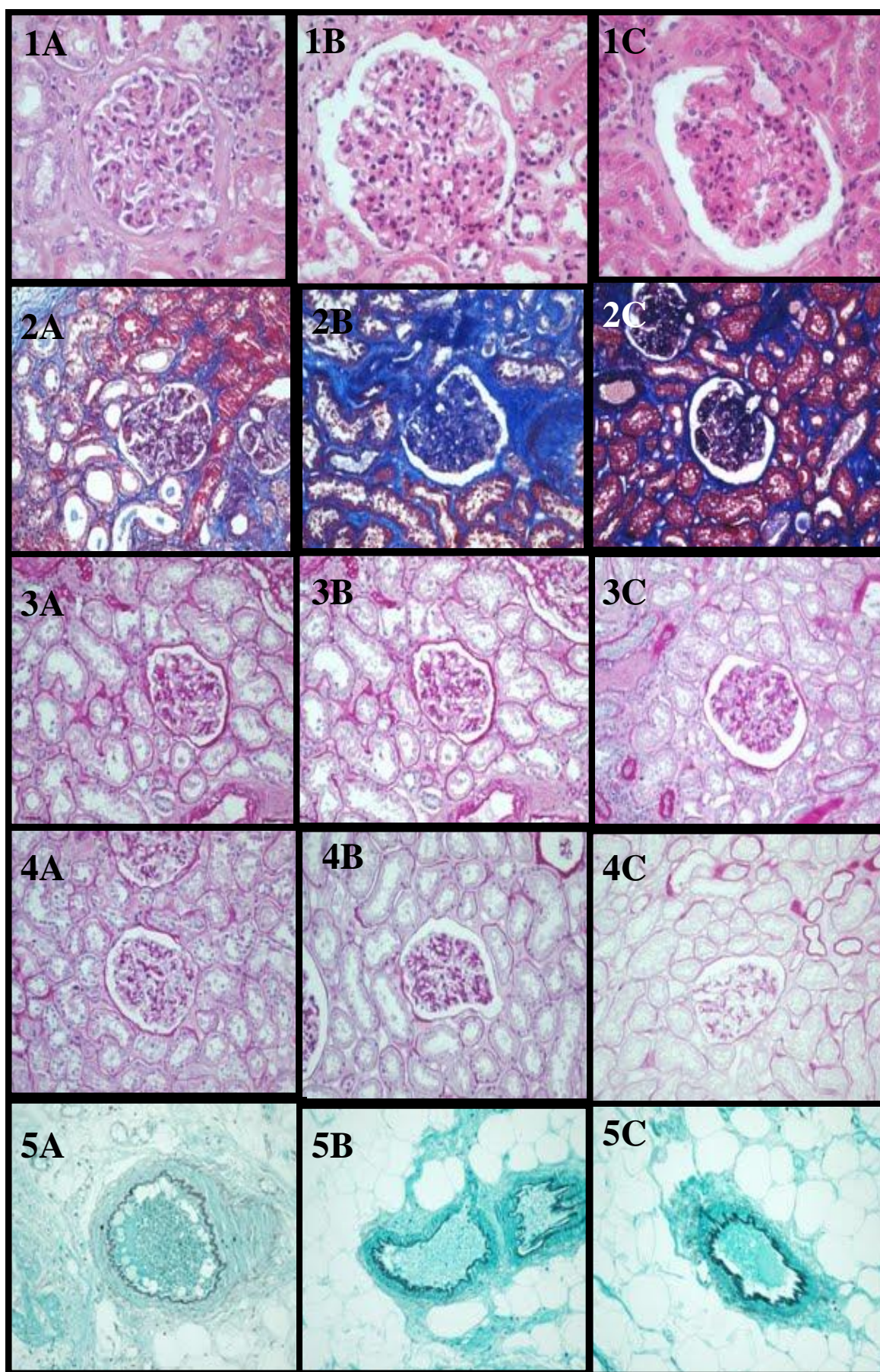


Figura 3 - Caso 17, Cortes de Rim. 1- Coloração HE,; 2- Coloração Tricrómio de Masson; 3- Coloração de PAS; 4- Coloração de PAS após digestase; 5- Coloração de Orceína (Caso 19, Cortes de Cólon). A - FORMOL; B - FINEFIX; C - RCL2
(1- Ampliação 400x; 2, 3, 4 e 5- Ampliação 200x):.

c) Imunohistoquímica

A avaliação da imunorreactividade dos tecidos foi realizada para os antígenos Desmina, Vimentina, Ki67, p53, Caderina, PSA, CAM5.2, AE1AE3, RE e Tireoglobulina.

Os parâmetros utilizados para a avaliação foram a especificidade, localização e intensidade da marcação e a existência de coloração inespecífica (fundo).

Existiram alguns problemas em relação aos fixadores alcoólicos que achamos possam ter a ver com a recuperação antigénica (de notar, uma vez mais que a recuperação antigénica a que se procede nestas técnicas, está optimizada para o formaldeído). Observámos nos fixadores alcoólicos que, nos casos em que a recuperação foi executada pelo calor, houve um excesso de coloração de fundo; em relação à especificidade verificamos também falsos positivos (particularmente no PSA com marcação de células basais).

A maior variabilidade relativamente aos marcadores imunohistoquímicos verificou-se nas imunomarcações para o CAM5.2 e para o antígeno AE1AE3, ambos com recuperação antigénica enzimática. Nos fragmentos fixados em Finefix e RCL2 observou-se perda quase total da arquitectura tecidular, sem especificidade e coloração muito pouco intensa. Os resultados obtidos com estes dois anticorpos variaram entre 0 e 2, com algumas diferenças de especificidade entre o RCL2 e o finefix

Tabela IV: Resultados obtidos na imunohistoquímica

Casos	Topografia	Cirurgia (hora)	Fixação (hora)	Fixação (tempo)	Processamento	DESMINA	VIMENTINA	HE	P53	RE	CADERIN	MIB	PSA	AE1AE	CAM5	TIREOGLOBULINA
Caso 1	RECTO (N)	11H	12,3H	72H	FORMOL	3	3	2	3							
Caso 1	RECTO (N)	11H	12,3H	72H	FINEFIX	2	2	2	3							
Caso 1	RECTO (T)	11H	12,3H	72H	FORMOL	2	3	3	3		2	3				
Caso 1	RECTO (T)	11H	12,3H	72H	FINEFIX	2	2	3	3		2	2				
Caso 2	ÚTERO	10H	11H	72H	FORMOL	3	2	3	3		2	2				
Caso 2	ÚTERO	10H	11H	72H	FINEFIX	2	3	3	2		2	3				
Caso 3	ENDOMÉTRIO	10H	11H	72H	FORMOL	2	2	3				2				
Caso 3	ENDOMÉTRIO	10H	11H	72H	FINEFIX	3	3	3				3				
Caso 4	PROSTATA	11H	12H	24H	FORMOL	3 céls basais +	3(céls basais)	3			3	3	3			
Caso 4	PROSTATA	11H	12H	24H	FINEFIX	2 céls basais +	2	3			1	3	3			
Caso 5	ESTOMAGO	11H	12H	24H	FORMOL		3	3	3		3	1+				
Caso 5	ESTOMAGO	11H	12H	24H	FINEFIX		2	3	2		2(artefacto?)	3				
Caso 6	INT. DELG + EST.	10H	11H	24H	FORMOL	3	3	2	3		3					
Caso 6	INT. DELG + EST.	10H	11H	24H	FINEFIX	2	over marcação	3	2		2					
Caso 7	CÓLON	11H	12H	24H	FORMOL	3	3	3	2-			1		3	3	
Caso 7	CÓLON	11H	12H	24H	FINEFIX	2	2	3	2-					má morf.	má morf.	
Caso 8	RIM	12H	12,3H	24H	FORMOL		2	3								
Caso 8	RIM	12H	12,3H	24H	FINEFIX		1	3								
Caso 9	VESÍCULA	11H	12H	24H	FORMOL		3	2								
Caso 9	VESÍCULA	11H	12H	24H	FINEFIX		2	3								
Caso 10	CÓLON N	10H	11H	24H	FORMOL		3	3								
Caso 10	CÓLON T	10H	11H	24H	FORMOL		3	1								
Caso 10	CÓLON N	10H	11H	24H	FINEFIX		2	2								
Caso 10	CÓLON T	10H	11H	24H	FINEFIX		2	2								
Caso 11	MAMA	10H	11H	24H	FORMOL	2	3	3	3	3	3					
Caso 11	MAMA	10H	11H	24H	FINEFIX	2	2	2	1	0	2					
Caso 12	PARTES MOLES	11H	12H	24H	FORMOL	3	2	2	2							
Caso 12	PARTES MOLES	11H	12H	24H	FINEFIX	1	2	2	2							
Caso 13	CÓLON	11H	12H	24H	FORMOL	2(marc. nas epiteliais)	3	2	3			3				
Caso 13	CÓLON	11H	12H	24H	FINEFIX	2(marc. nas musc.)	3	3	3			2				
Caso 14	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FORMOL	2	3	2	3		3	2				3
Caso 14	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FORMOL	3	3	3	3		3	2				3
Caso 14	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FINEFIX	2	2	2			3	0				0 (s/ céls foliculares)
Caso 14	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FINEFIX	3	3	2			3	0				1
Caso 15	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FORMOL	3	2	2	3		3	3				3
Caso 15	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FORMOL	3	3	3	3		3	3				3
Caso 15	TIREOIDE N	10H	11H	24H	FINEFIX	3	3	3	2		3	2				2 (céls folic não coram)
Caso 15	TIREOIDE T	10H	11H	24H	FINEFIX	3	3	3	3		2	2				2+
Caso 15	TIREOIDE N	10H	11H	24H	RCL2	3	3	3	3		3	2				2
Caso 15	TIREOIDE T	10H	11H	24H	RCL2	2(poucas f. musculares)	3	3	2+		3	2				2
Caso 16	ESTOMAGO	12H	12,3H	24H	FORMOL		3	3				1				
Caso 16	ESTOMAGO	12H	12,3H	24H	FINEFIX		3	3				0				
Caso 17	RIM N	10H	11H	24H	FORMOL	3		3			3	3		3	3	
Caso 17	RIM T	10H	11H	24H	FORMOL	3		3			2	3		3	3	
Caso 17	RIM N	10H	11H	24H	FINEFIX	2		3			2	2		0	0	
Caso 17	RIM T	10H	11H	24H	FINEFIX	2		3			3	2		0	0	
Caso 17	RIM N	10H	11H	24H	RCL2	2		3			2	2+		1	1	
Caso 17	RIM T	10H	11H	24H	RCL2	2		3			3	2+		1	1	
Caso 18	VESÍCULA BILIAR	11H	12H	24H	FORMOL			3			3	2				
Caso 18	VESÍCULA BILIAR	11H	12H	24H	FINEFIX			3			2	0				
Caso 18	VESÍCULA BILIAR	11H	12H	24H	RCL2			3			3	0				
Caso 19	CÓLON N	11H	12H	24H	FORMOL			3			3	3				
Caso 19	CÓLON T	11H	12H	24H	FORMOL			3			3	3				
Caso 19	CÓLON N	11H	12H	24H	FINEFIX			3			2	1				
Caso 19	CÓLON T	11H	12H	24H	FINEFIX			3			3	1				
Caso 19	CÓLON N	11H	12H	24H	RCL2			3			3	2				
Caso 19	CÓLON T	11H	12H	24H	RCL2			3			3	2				

Tabela V: Comparação dos resultados obtidos na IHQ, em tecidos fixados em formaldeído ou em finefix*.

ANTICORPOS	Avaliação igual ao formaldeído	Sup. Ao resultado do formaldeído	Inf. ao resultado do formaldeído
	(nº de casos)	(nº de casos)	(nº de casos)
DESMINA (n=14)	4	4	6
VIMENTINA (n=21)	5	2	14
P53 (n=24)	6	0	18
RE (n=2)	0	0	2
CADERINA (n=20)	5	0	15
MIB (n=21)	2	3	16
PSA (n=2)	2	0	0
AE1AE3 (n=2)	2	0	0
CAM5.2 (n=2)	2	0	0
TIREOGLOBULINA (n=8)	0	0	8

*** os resultados obtidos com RCL2 não foram considerados por terem sido estudados poucos casos.**

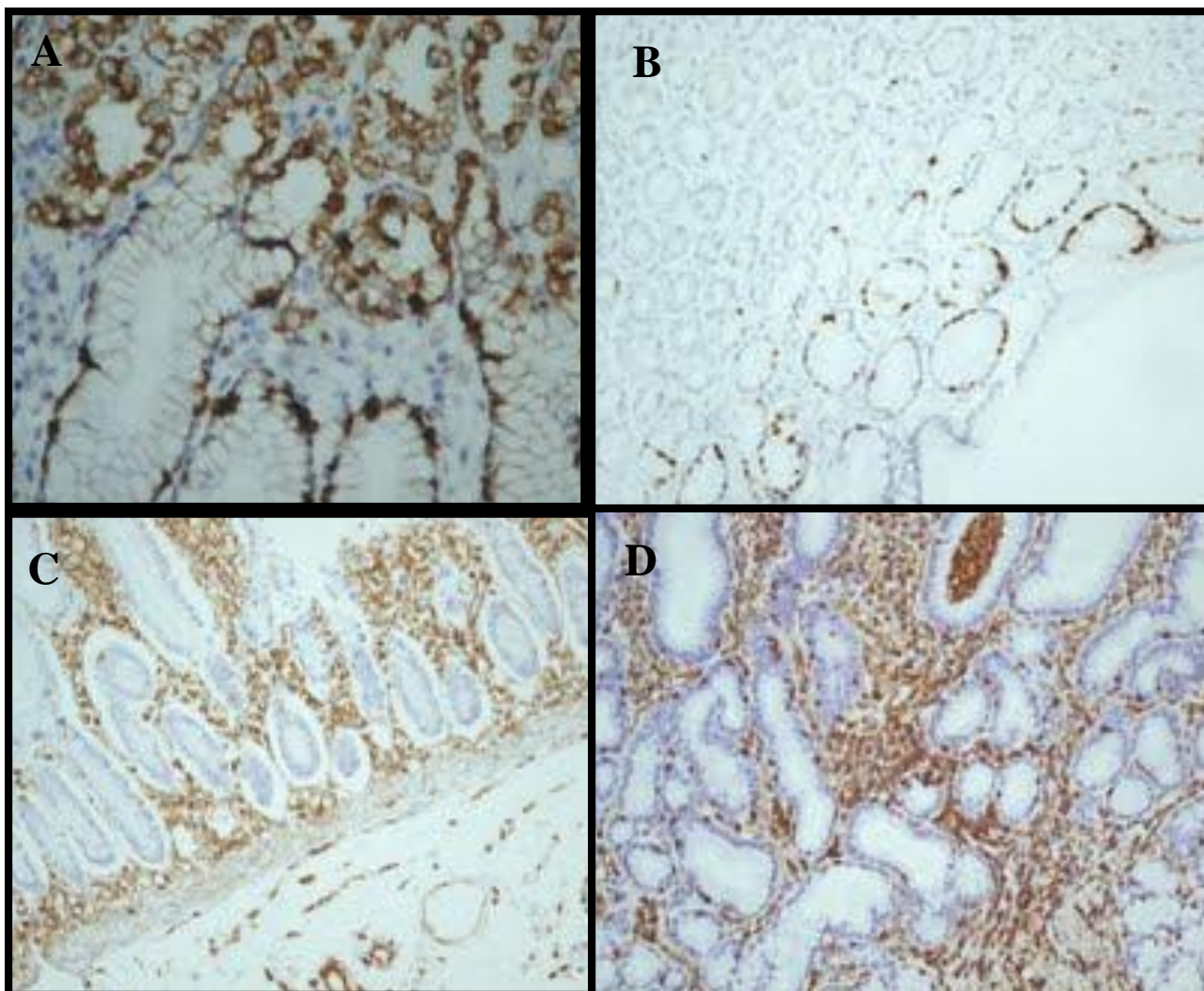


Figura 4 - Caso 20, Cortes de Cólon. Coloração por IHQ: **MIB 1** (A e B); **Vimentina** (C e D);
A e C - FORMOL; **B e D** - FINEFIX; Ampliação: 400x (**A**); 200x (**B, C e D**)

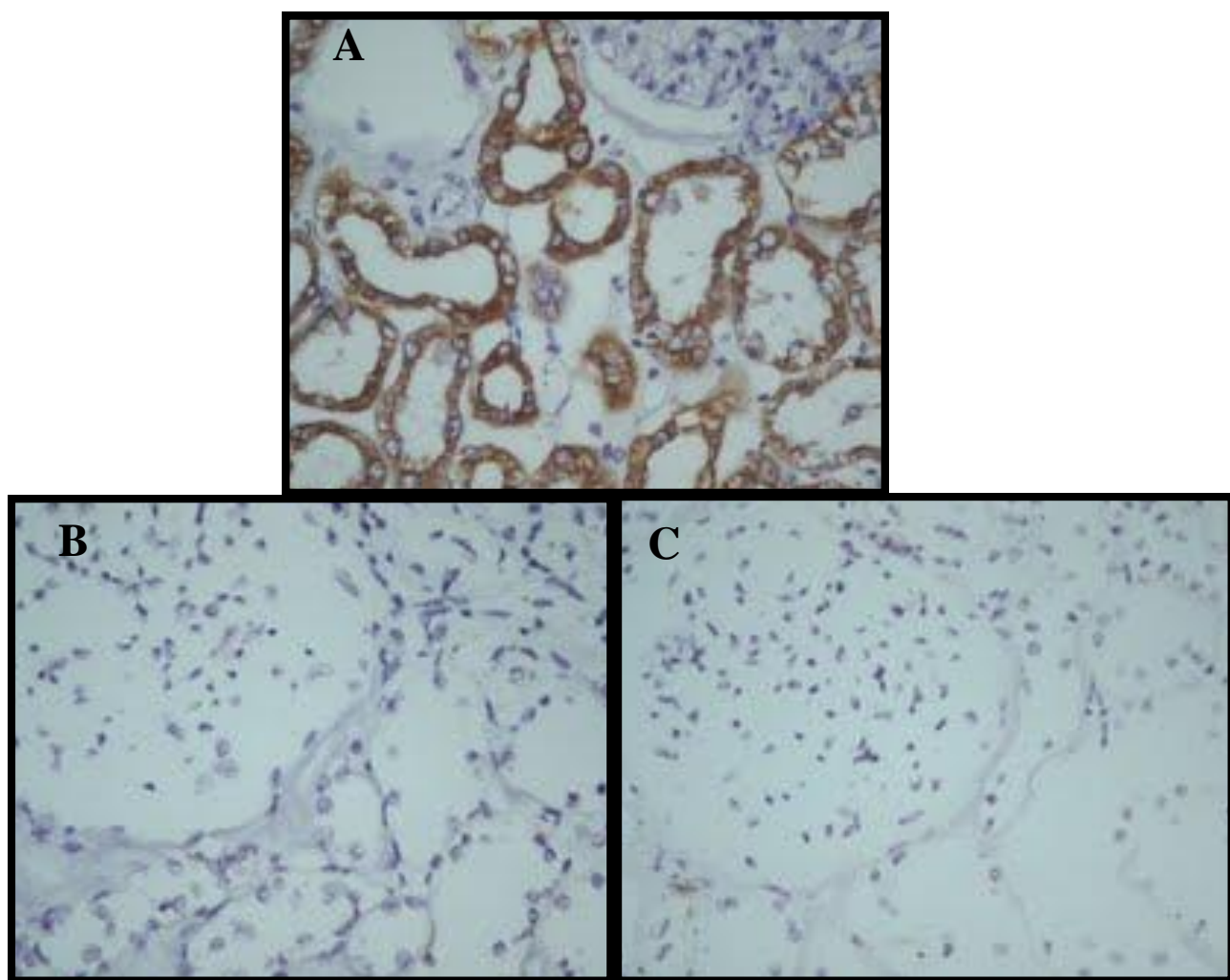


Figura 5 - Caso 21, Cortes de Pulmão. Coloração Cam 5.2 por IHQ, Ampliação 400 x:
A - Formol; **B** - Finefix; **C**- RCL2.

V. Discussão

O objectivo geral deste trabalho foi o de comparar o desempenho de três fixadores: formaldeído, (elaborado à base de aldeídos), finefix e RCL2 (ambos produzidos à base de álcoois) relativamente à aplicação de técnicas de diagnóstico utilizadas por rotina em laboratórios de AP.

Como já referido anteriormente, o fixador RCL2 não foi utilizado em todos casos; problemas logísticos impediram que isso acontecesse. No entanto, mesmo com esta casuística, achamos que os resultados obtidos com este fixador são interessantes de comentar.

Foi possível demonstrar que a coloração de HE em tecidos fixados em finefix e RCL2 é reproduzível à efectuada em tecidos fixados em formaldeído. Mais ainda, verificou-se que a preservação da morfologia tecidular, bem como o padrão nuclear, apresentam uma (aparente) melhoria com a utilização dos fixadores alcoólicos: fornece um bom detalhe nuclear e intensidade da coloração nuclear, o que pode permitir um aumento da sensibilidade do diagnóstico.

Em relação à histoquímica, observaram-se resultados semelhantes para as colorações especiais PAS e Orceína, quando comparada a fixação entre o formaldeído e os dois fixadores "substitutos", tendo-se contudo observado variações de coloração em relação ao fixador finefix na coloração Tricrómio Especial.

Nesta técnica, na comparação com os dois tipos de fixadores, foram detectadas diferenças visíveis no tecido conjuntivo (particularmente nas fibras de colagénio) e na preservação da fibrina. O formaldeído, com o protocolo perfeitamente optimizado, foi avaliado com classificação de 2 e 3; o

RCL2 obteve resultados com variações também entre 2 e 3, semelhantes às do formaldeído. Os resultados mais instáveis foram das amostras fixadas em finefix: os resultados variam entre o 1 e o 3 (de referir que o protocolo utilizado foi o mesmo para todos os casos e para todos os fixadores, tendo sido executado pelo mesmo operador), sendo as diferenças mais visíveis ao nível do tecido conjuntivo (fibras de colagénio).

Em relação ao PAS os resultados são semelhantes para todos os fixadores (entre 2 e 3) e de uma forma geral bons com manutenção da estrutura tecidual e celular, boa intensidade de marcação e especificidade.

Na histoquímica Orceína os resultados foram positivos para todos os fixadores, obtendo-se boa coloração, sem fundo e marcação positiva nas fibras elásticas tecidulares.

Já na coloração PAS após diastase obtiveram-se resultados pouco satisfatórios em relação aos fixadores alcoólicos; nestes fixadores a avaliação foi entre 0 e 1, tendo os tecidos apresentado destruição parcial em alguns casos; perda da estrutura tecidual, sem visualização de colagénio, nem células de suporte, sem mucopolissacarídeos. No fixador formaldeído esta coloração teve uma boa avaliação, boa manutenção da arquitectura celular, mucopolissacarídeos bem marcados, boa digestão enzimática (sem visualização do glicogénio). Uma vez que nesta coloração se procede a uma digestão enzimática, pensamos que este factor possa ser limitativo para este tipo de fixadores (base alcoólica). Sendo o crosslink menos acentuado nos fixadores alcoólicos, é possível que a estrutura destes tecidos seja mais susceptível aos efeitos das enzimas (resultados semelhantes foram verificados em dois anticorpos, ver em seguida).

De referir que estes protocolos histoquímicos estão excelentemente otimizados para o fixador formaldeído mas não para fixadores alcoólicos, e é possível que a optimização do protocolo possa permitir obter resultados razoáveis.

A qualidade da marcação imunohistoquímica depende, do fixador utilizado, dos epítopes alvo e dos métodos de recuperação antigénica, entre outros factores. De acordo com os antigénios que se pretende detectar, é necessário efectuar o método de recuperação mais adequado. ⁽⁵⁾ As condições para esta recuperação podem ser ajustadas consoante o tipo de fixador utilizado, assim como o tempo de fixação tecidular. ⁽⁴⁹⁾

Como já foi referido, o método imunohistoquímico utilizado foi optimizado para tecidos fixados em formaldeído, o que por si só pode ser limitativo para os fixadores alcoólicos.

De uma forma geral verificamos uma perda da reactividade imunocitoquímica nos tecidos fixados em fixadores alcoólicos. Um dos antigénios avaliados foi a Vimentina, que é o primeiro filamento interno a ser expresso durante a diferenciação celular; esta é uma proteína que existe em todos os tecidos, e a sua antigenicidade é facilmente modificada por alterações nos processos de fixação. ⁽⁵⁰⁾ Desta forma, a imunoexpressão da Vimentina é usada muitas vezes como controlo da qualidade do material, permitindo verificar se a imunorreactividade do tecido foi mantida ou alterada pela fixação utilizada. Neste estudo obtivemos bons resultados com este anticorpo, em todos os casos fixados em formaldeído, sendo a marcação nos fixadores alcoólicos muito variável, apresentando alguns, até, uma marcação superior à encontrada no formaldeído. As variações de marcação reflectem-se não só a nível de intensidade ou nº de células marcadas, mas também na especificidade. Por

exemplo na avaliação do antígeno tireoglobulina, ao contrário do que esperávamos, não obtivemos nos marcadores alcoólicos, marcação nas células foliculares da tireoide (que no mesmo caso fixado em formaldeído ficaram com boa marcação). Este é um exemplo de um resultado falso negativo. De forma semelhante, a marcação com o PSA não foi reprodutível, sendo positivo para a amostra de próstata fixada em formaldeído e fraco ou negativo para as amostras em fixadores alcoólicos.

Estas discrepâncias são de muita relevância, uma vez que os marcadores imunocitoquímicos são frequentemente decisivos no diagnóstico diferencial das neoplasias.

No geral em quase todos os marcadores imunohistoquímicos, tivemos alguns problemas ou de falta de marcação ou de *over marcação*; uma das explicações para esta heterogeneidade é a técnica IHQ utilizada neste estudo estar otimizada para tecidos fixados em formaldeído, sendo necessário proceder à optimização desta técnica para tecidos fixados em fixadores alcoólicos, principalmente na etapa da recuperação antigénica. É possível também que outros anticorpos, de diferentes clones, sejam mais adequados para estes novos fixadores.

Tal como verificado na histoquímica, os fixadores alcoólicos também se mostraram muito limitados quando a técnica imunohistoquímica envolvia pré tratamento enzimático (AE3/AE1 e CAM5.2). De uma forma geral, a marcação era fraca ou ausente com alguma perda da estrutura tecidular, sendo os resultados muito variáveis e com baixa reprodutibilidade. Esta é uma limitação importante dos novos fixadores, sendo preciso investigar se alterações no tempo de fixação ou concentração do fixador, por exemplo, poderão ser factores modificadores.

Em conclusão, verificamos neste trabalho que, em termos de técnicas de rotina (HE) e algumas técnicas histoquímicas os novos fixadores têm um desempenho satisfatório. Os novos fixadores não mostraram, contudo, um bom desempenho em imunohistoquímica, mas é provável que, para alguns marcadores, uma otimização eficaz permita obter melhores resultados. Aparentemente, os fixadores alcoólicos não são adequados para técnicas (histoquímicas e imunohistoquímicas) que envolvam pré-tratamentos enzimáticos.

Perspectivas futuras

É possível que este tipo de fixadores alcoólicos venham a ser uma boa alternativa num futuro próximo, mas não sem antes serem otimizados todos os protocolos que envolvam a sua utilização. Na histoquímica, particularmente em histoquímicas tricrómicas, julgamos ser possível melhorar a heterogeneidade e a marcação excessiva do tecido conjuntivo, elaborando estudos para otimizar os protocolos histoquímicos (tempos, concentrações, etc).

Quanto às marcações que envolvem prétratamentos enzimáticos, tanto na histoquímica como na imunohistoquímica, este tipo de fixadores têm graves problemas, verificando-se mesmo destruição tecidular na histoquímica. É possível que a utilização destes novos fixadores inviabilize a utilização destas técnicas.

Pensamos que a optimização menos problemática, em relação aos tratamentos enzimáticos, será em relação à imunohistoquímica. Existem actualmente diversas formas alternativas de proceder à recuperação antigénica dos epítopes (p.ex. pelo calor) e várias formulações de soluções para esse fim (EDTA, citrato, comerciais...) assim como múltiplos anticorpos para uma mesma proteína, que poderão ser testados para optimização destes novos fixadores.

Na continuação deste trabalho seria também fundamental testar o desempenho destes novos fixadores alcoólicos na preservação do DNA e RNA, uma vez que é crescente o recurso à patologia molecular, tanto para diagnóstico, como para prognóstico e cada vez mais para decisão terapêutica.

VI. Referências bibliográficas:

1. Feeney-Burns L: The early years of research. *Prog Clin Biol Res* 1985, 190:3-23;
Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP: Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985, 33:845-853
2. "Historia da Luz e das cores" Volume 1 - Luís Miguel Bernardo-2ª edição Porto. Janeiro 2009. Editora da Universidade do Porto. Série do Saber, 1
3. (Leong ASY, James CL, Thomas AC: *Handbook of Surgical Pathology*. New York, Churchill Livingstone, 1996, pp viii, 321)
4. (Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques. Fixation and Fixatives*; 6º edition. Edinburgh: Churchill Livingstone 2008; p. 63-70)
5. Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotechnic & Histochemistry* 2007; 82 (3): 133-140.
6. Principles and Practice Emmert-Buck et al.(Eds): *Dissecting the Molecular Anatomy of Tissue*. Springer Berlin Heidelberg 2005; 3.4 Tissue Fixation and Snap-freezing)
7. Feeney-Burns L: The early years of Research. *Prog Clin Biol Res* 1985, 190:3-23
8. Leong Anthony S-Y. Fixation and Fixatives. In: Woods AE, Ellis RC, editors. *Laboratory Histopathology: A Complete Reference*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. P. 4.1-2 a 4.1-20
9. Peracchia, C. MILLER, B.S. (1972) New glutaraldehyde fixation procedures. *Journal of Ultrastructure Research*, 39: 57-64
10. Jones ML, Bancroft JD, Gamble M. Fixation and fixatives Theory and practice of Histological Techniques p. 63-70

11. . Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Am J Pathol. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids 2002 Dec;161(6):1961-71. Review.
12. Ingrid E. Chrsnick, Jeffrey T. Mason, Timothy J. O'Leary, Carol B. Fowler. Elevated Pressure Improves the Rate of Formalin Penetration while Preserving Tissue Morphology. Journal of cancer 2010; 1:178-18)
13. Medawar, P.B. (1941) The rate of penetration of fixatives. Journal of the Royal Microscopical Society. 61: 46-57
14. Werner M, Chott H A, Fabiano A, Battifora H. ; Effect of formalin fixation and procession on immunohistochemistry, Am J Surg Pathol 2000 Jul; 24(7): 1016-9
15. Angelo M. de Marzo, MD, PhD, Helen H. Fedor, BS, Wesely R. Gage, and Mark A. Rubin, MD. Inadequate Formalin Fixation Decreases Reliability of p27^{kip1} Immunohistochemical Staining: Probing Optimal Fixation Time Using High-Density Tissue Microarrays; Human Pathology volume 33 n°7 (July 2002); 756-760
16. Mets b, Kersten GF, et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins reations with insulin. Bioconjug Chem. 2006 May-Jun; 17(3); 815-22
17. John A. Kiernan. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde and Gluteraldehyde: What they are and what they do: department of Anatomy & Cell Biology, The University of Western Ontario, LONDON, Canada; Microscopy Today 00-1 pp 8-12. 2000
18. Korneeva GA, Loktev SM. The synthesis of ethylene glycol from formaldehyde. Russian. Chemical. Rev 1989; 58(1): 58 73
19. Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. Biotechnic % Histochemistry 2007; 82(3): 137-143

20. Bancroft JD, Gamble M. Fixation and Fixatives Theory and Practice of Histological Techniques. 6th Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone 2008;p. 63-70
21. Ingrid E. Chesnick, Jeffrey T. Mason, Timothy J. O'Leary, Carol B. Fowler Elevated pressure improves the rate of formalin penetration while preserving tissue morphology. Journal of cancer 2010; 1: 178-183
22. Kiernan JA. Preservation and retrieval of antigens for immunohistochemistry- methods and mechanisms. 1. Effects of formaldehyde fixation. The cutting edge. 5-8.
23. Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. Biotechnic& Histochemistry 2007; 82(3): 133-140.
24. Leong ASY, James CL, Thomas AC: Handbook of Surgical Pathology. New York, Churchill Livingstone, 1996. Pp viii, 321
25. Melissa A. Melan. Overview of cell fixation and impermeabilization Methods in molecular Biology, vol. 34: Immunocytochemical Methods and Protocols; Edited by L C Javois 1994 Humana press inc. Totowa, Nj)
26. Kok LP, Boon ME: Microwaves for the art of microscopy. Coulomb Press, Leyden, 2003; xvi+ p. 368) + Bancroft: Fixation and Fixatives 63-70
27. Leong ASY.fixation and Fixatives. In: Woods AE Ellis RC, editors. Laboratory Histopathology: A Complete Reference. Edinburgh: Churchill Livinsgtone; 1994. P. 4.1-2 a 4.1-20
28. Jones ML. Lipids. In: bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone 2008; p. 187-215
29. Ryter A (1988). "Contribution of new cryomethods to a better knowledge of bacterial anatomy". Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 139 (1): 33-44. PMID 3289587.

30. Friedrich, CL; D Moyles, TJ Beveridge, REW Hancock (2000). "Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (8): 2086-2092. DOI:10.1128/AAC.44.8.2086-2092.2000
31. Isabella Dotti, PhD, Serena Bonin, PhD, Giorgio Basilli, DSc, Ermanno Nardon, PhD, Alessandro Balani, MD, Salvatore Siracusano, MD, Fabrizio Zanconati, MD, Silvia Palmisano, MD, Nicolo De Manzini, and Giorgio Stanta, MD. Effects of Formalin, Methacarn, and Finefix Fixatives on RNA Preservation; *Diag Mol Pathol* 2010; 19: 112-122
32. Review: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nuclei acids Mythily Srinivasan, Daniel Sedmak and Scott Jewell: *American Journal of Pathology*: 2002; 161:1961-1971
33. Goldstein Bernard D. PhD, and Smith Martyn T. PhD; Formaldehyde: Citation for most recent IARC review; *IARC Monograph* 88, 2006
34. C. Bossetti, J. K. McLaughlin, R.E. Tarone, E. Pira & C. La Vecchia; Formaldehyde and cancer risk: a quantitative review of cohort studies through 2006. *Annals of Oncology* 19: 29-43, 2008
35. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol.100F Summary of Evaluations. "IARC Monografias"* (2009)
36. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol.88 Summary of Evaluations. "IARC Monografias"* (2004)
37. Vincent James Coglian, Yann Grosse, Robert A. Baan, Kurt Straif, Marie Béatrice Secretan, El and Fatiha Ghissassi: Meeting Report: Summary of IARC Monographs on Formaldehyde, 2-Butoxyethanol, and 1-tert-Butoxy-2-Propanol. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

38. Sandra Lassalle, Véronique Hofman, Marius Llie, Virginie Gavric-Tanga, José Santini, Baharia Mograbi and Paull Hofman; Assesement of morfology, Antigenicity and nuclei acid Integrity for Diagnostic Thyroid Pathology Using Formalin Substitute Fixatives. THIROID Volume 19, number 11, 2009. Mary Ann Liebert, inc.
39. Millestone-Handbook of protocols: (MM029) for fixation and immunohistoquemistry; March 2007
40. Van Essen HF, Verdaasdonk MA, Elshof SM, de Weger RA, van Diest PJ. Department of Pathology, University Medical Center Utrecht, The Netherlands. Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. 2010 Dec;63(12):1090-4. Epub 2010 Oct 26.
41. Matthias Preusser, Sabina Plumer, Elisabeth Dirnberger, Johannes A. Hainfellnar, Christine Mannhalter. Fixation of Brain Tumor Biopsy Specimens with RCL2 Results in Well-preserved Histomorphology, Immunohistochemistry and Nuclei Acids: Brain Pathology 20 (2010) 1010-1020
42. Olga Eliascheff; Um novo fixador em technica histologica; Anais Brasileiros de Dermatologia; VOLUME 4 - Nº 3
43. Sgarbosa, Sílvia Helena Pereira Vergili; Análise histológica, histoquímica e imunohistoquímica da mucosa de palato duro em pacientes portadores de síndrome de Apert Bauru; s.n; 2009. 142 p. ilus, tab, graf
44. George Luiz de Souza AraÚjo; Adriana Maria da Silva Telles; Francisco Eduardo de Albuquerque Lima; Nicodemos Teles de Pontes Filho; Marcos CÉsar Feitosa de Paula Machado. Análise histológica e histoquímica de fatores prognósticos em pacientes com retocolite ulcerativa, Rev bras Coloproct, 2009;29(1): 007-014.
45. Cristina da Costa Miguel; Emanuel Savio de Souza Andrade; Danielle Albuquerque Pires Rocha; Roseana de Almeida Freitas; Lélia Batista e tal; Expressão imuno-histoquímica da vimentina e do HHF-35 em fibroma de células

gigantes, hiperplasia fibrosa e fibroma da mucosa oral. Journal of Applied Oral Science ;Print version ISSN 1678-7757:

46. J. Appl. Oral Sci. vol.11 no.1 Bauru Jan./Mar. 2003)
47. Olanrewaju Muisi Adedamola Ladipo¹; Marcos Brasilino de Carvalho²; Abrão Rapoport, ECBC-SP²; Victor Eduardo Arrua Arias³; Luiz Carlos Filgueiras Leiro¹; Determinação imunohistoquímica da presença de células mióides em pacientes submetidos à timectomia: Rev. Col. Bras. Cir. Vol. 31 - Nº 4: 242-247, Jul. / Ago. 2004
48. Jesus, Eliane C; Matos, Delcio; Artigiani, Ricardo; Waitzberg, Angela F. L; Goldenberg, Alberto; Saad, Sarhan Sydney. Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins; Revistas Científicas em Ciências da Saúde: 20(6):422-427, nov.-dez. 2005.
49. Grizzle we, Fredenburgh JL, Myers R. Fixation of tissues. In: Bancroft JD, Gamble M, editors. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone 2008; p. 53-74.
50. Robinson G, Ellis IO, MacLennan KA. Immunocytochemistry. In: Bancroft JD, Gamble M, editors. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone 2008; p. 413-436

VII. Weblografia

- W1.** <http://www.ff.ul.pt/paginas/bio/LabBiol4.pdf> em 28/11/2010
- W2.** (<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTOTCH.html>) em 29/11/2010
- W3.** (<http://library.med.utah.edu/Webpath/HISTHTML/HISTOTCH/HISTOTCH.html>) em 29/11/2010
- W4.** <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/formaldehyde> em 7/12/2010, em 10/12/2010
- W5.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191929>), em 10/12/2010
- W6.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191929>, em 11/12/2010
- W7.** http://www.google.pt/search?hl=ptPT&rlz=1R2ADBS_enPT329&q=+++trico+de+masson&aq=f&aqi=g1&aql=&oq=&gs_rfai=, em 11/12/2010
- W8.** <http://www.revistacirurgiabmf.com/2006/v6n2/v6n26.pdf>, em 12/12/2010
- W9.** http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/pas_diastase_ellis.htm, em 12/12/2010
- W10.** <http://www.dermatopatologia.com.br/tecnicas.htm>, em 12/12/2010
- W11.** <http://pb.merck.de/servlet/PB/show/1288810/107100es.pdf> .em 4 Dez. 2010
- W12.** <http://es.answers.yahoo.com/question/index?qid=20100305132550AAFjByQ> em 4 Dez. 2010
- W13.** http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167624442005000100010) em 4 Dez. 2010.
- W14.** <http://www.dako.com/dist/download.pdf?objectid=105470005> em 11 dez. 2010

W15. http://www.dako.com/ar38/p118940/prod_products.htm :em 4 Dez. 2010

W16. <http://www.labome.com/review/gene/human/prostate-specific-antigen-antibody-western-blot.html>A. em 4 Dez 2010

W17. http://www.dako.com/dist/ar38/p235189/prod_products.htm?setCountry=true&purl=ar38/p235189/prod_products.htm: em 4 Dez 2010

ANEXOS

A) HEMATOXILINA - EOSINA

1. Desparafinar, hidratar e lavar os cortes em água corrente durante 5 minutos. Lavar os cortes em água destilada
2. Coloração nuclear com Hematoxilina de Gill (solução comercial) durante 3 minutos
3. Lavagem rápida em água corrente
4. Passagem rápida em água amoniacal para azular os cortes
5. Coloração citoplasmática com Eosina aquosa (solução comercial) durante 5 minutos
6. Lavagem rápida em água corrente
7. Desidratação em 3 banhos de álcool absoluto

B) TRICRÓMIO DE MASSON ESPECIAL

- 1- Desparafinar, hidratar e lavar os cortes em água corrente durante 5 minutos. Lavar os cortes em água destilada
- 2- No tecido fixado numa solução aquosa de formaldeído a 10% tamponado, é necessário realizar uma mordagem dos cortes em solução de Bouin durante 30 a 60 minutos a 56°C. Quando o fragmento é fixado em solução de Bouin, não é necessário realizar este passo.
- 3- Lavar os cortes em água corrente até desaparecer a cor amarela dos cortes (para retirar excesso de ácido pícrico) cerca de 10 minutos
- 4- Lavar os cortes em água destilada
- 5- Corar os cortes com a solução de Hematoxilina férrica de Weigert (mistura das soluções A e B em volumes iguais), durante 10 minutos
- 6- Lavar muito bem os cortes em água corrente e, posteriormente em água destilada
- 7- Corar os cortes na solução ácida de Ponceau-Fucsina durante 15 minutos
- 8- Lavar os cortes em água destilada
- 9- Diferenciar os cortes com a solução aquosa de ácido fosfomolibdico a 1%, durante 5 minutos
- 10- Sem lavar, corar os cortes com a solução de Azul de anilina durante 5 minutos
- 11- Lavar, bem, os cortes em água destilada
- 12- Desidratar os cortes em álcool a 96% e álcool absoluto, diafanizar em xilol e montar em meio sintético (entellan)

Reagentes:

Solução de Bouin (solução fixadora):

Juntar aproximadamente:

Solução aquosa saturada de ácido pícrico 75ml

Formaldeído comercial a 37-40% 25 ml

Ácido acético glacial 5 ml

Hematoxilina Férrica de Weigert

Solução A:

Hematoxilina..... 1,0g

Álcool 96° q.b.p. 100,0 ml

Solução B:

Sol. aquosa de cloreto de ferro III a 29%.....	4 ml
Água destilada	95 ml
Ácido clorídrico concentrado	1 ml

Preparação da solução de Hematoxilina férrica de Weigert

Misturar, num tubo de vidro, a solução A e a solução B em volumes iguais (1:1). Esta solução deve ser preparada na altura em que vai ser utilizada.

Solução ácida de Ponceau-Fucsina

Fucsina ácida.....	0,3 g
Ponceau de xilidina.....	0,7 g
Água destilada.....	99 ml
Ácido acético.....	1 ml

Colocar os corantes e uma pequena quantidade da água destilada num almofariz. Triturar bem os corantes e ir adicionando água destilada para facilitar a dissolução dos corantes. Adicionar a restante água destilada e o ácido acético. Quando os corantes estiverem dissolvidos, filtrar a solução para um frasco devidamente rotulado (nome da solução corante e data da preparação), para armazenamento. A solução está pronta a ser usada

Solução de Azul de Anilina

Água destilada	98 ml
Ácido acético glacial	2 ml
Azul de anilina	2,5 g

Preparar a solução aquosa de ácido acético a 2% e utilizá-la como solvente para a dissolução do corante azul de anilina. Deitar o corante e o solvente num matraz de vidro e agitar, com a ajuda de um agitador magnético, até completa dissolução do soluto.

Solução aquosa de ácido fosfomolibdico a 1%

C) PAS COM E SEM DIASTASE

- 1- Desparafinar, hidratar e lavar os cortes em água corrente.
- 2- Lavar os cortes em água destilada.
- 3- Incubar um dos cortes na solução diastase a uma temperatura de 37°C durante 20 minutos. Retirar o corte da solução da α -amilase e lavar em água corrente durante 5 minutos. Colocar o outro corte numa tina de ranhuras contendo água destilada à temperatura ambiente.
- 4- Colocar os dois cortes numa solução aquosa de ácido periódico a 5% de durante 10 minutos.
- 5- Lavar os cortes em água corrente seguida de lavagem em água destilada.
- 6- Colocar os cortes no reagente Schiff durante 15 minutos.
- 7- Lavar os cortes em água corrente durante 10 minutos para acentuar a cor, seguida de uma lavagem em água destilada.
- 8- Contrastar os cortes com hematoxilina de Gill III durante 2 minutos.
- 9- Lavar os cortes em água corrente durante 5 minutos. Passar os cortes por água destilada.
- 10-Desidratar, diafanizar e montar os cortes em meio sintético ("entellan").

Reagentes

Solução tampão α -amilase a 0,4% (A-3176, Sigma)

Dissolver 0,40 g de α -amilase em 100 ml de tampão fosfato salino, pH 6

Solução aquosa de ácido periódico a 5%

Reagente Schiff (comercial)

Hematoxilina de Gill III (comerci

SEM DIASTASE

- 11- Desparafinar, hidratar e lavar os cortes em água corrente.
- 12-Lavar os cortes em água destilada.
- 13-Incubar um dos cortes na solução diastase a uma temperatura de 37°C durante 20 minutos. Retirar o corte da solução da α -amilase e lavar em água corrente durante 5 minutos. Colocar o outro corte numa tina de ranhuras contendo água destilada à temperatura ambiente.
- 14-Colocar os dois cortes numa solução aquosa de ácido periódico a 5% de durante 10 minutos.
- 15-Lavar os cortes em água corrente seguida de lavagem em água destilada.
- 16-Colocar os cortes no reagente Schiff durante 15 minutos.

- 17-Lavar os cortes em água corrente durante 10 minutos para acentuar a cor, seguida de uma lavagem em água destilada.
- 18-Contrastar os cortes com hematoxilina de Gill III durante 2 minutos.
- 19-Lavar os cortes em água corrente durante 5 minutos. Passar os cortes por água destilada.
- 20- Desidratar, diafanizar e montar os cortes em meio sintético ("entellan").

Reagentes

Solução tampão α -amilase a 0,4% (A-3176, Sigma)

Dissolver 0,40 g de α -amilase em 100 ml de tampão fosfato salino, pH 6

Solução aquosa de ácido periódico a 5%

Reagente Schiff (comercial)

Hematoxilina de Gill III (comercial)

D) ORCEÍNA

- 1- Desparafinar, hidratar e lavar os cortes em água corrente.
- 2- Lavar os cortes em água destilada.
- 3- Incubar os cortes em solução de Orceína durante 60 minutos.
- 4- Lavar os cortes em água corrente seguida de lavagem em água destilada.
- 5- Diferenciar os cortes numa solução alcoólica acidificada a 1% (controlar ao microscópio).
- 6- Lavar os cortes em água corrente durante 10 minutos para completar a diferenciação.
- 7- Desidratar, diafanizar e montar os cortes em meio sintético ("entellan").

Reagentes

Solução alcoólica acidificada (solução álcool-ácido)

- Álcool a 70%..... 99 ml
- Ácido clorídrico conc..... 1 ml

Solução de Orceína

- Orceína sintética.....1 g
- Álcool a 70%.....100 ml
- Ácido clorídrico conc..... 2 ml

Colocar o corante orceína num almofariz e adicionar uma pequena quantidade do álcool a 70%. Com a ajuda do pilão, triturar a orceína, de forma a facilitar a sua dissolução. Durante a trituração, adicionar o restante álcool a 70% (pequenas quantidades de cada vez) para a dissolução do corante. Deitar os 2 ml de ácido clorídrico na solução e vertê-la para um matraz. Colocar o matraz na placa de agitação para dissolução completa do corante. Filtrar a solução para um frasco devidamente rotulado, para armazenar a solução. A solução está pronta a ser utilizada.

Solução stock contrastante (solução de verde luz)

- Verde Luz 1 g
- Ácido acético glacial 0,5 ml
- Água destilada100 ml

Misturar os solutos pela ordem indicada.

Solução contrastante (solução de verde luz)

A solução contrastante de verde luz é uma solução diluída da solução stock em água destilada (1:10).

E) Protocolo IHQ

- 1- Desparafinação e rehidratação
- 2- Desmascaramento induzido pelo calor, caso necessário
- 3- Bloqueio de Peroxidase endógena (quando for usado AEC ou DAB como cromogenio) 3 minutos
- 4- Incubação com atcs primários 30 a 60 minutos à temperatura ambiente
- 5- Lavar uma vez em Tampão lavagem, 2 mins
- 6- Incubação com link DuoVisionPlus 10 mins à temperatura ambiente
- 7- Lavar uma vez em Tampão lavagem, 2 mins
- 8- Incubação com marcador DuoVisionPlus 10 mins à temp. ambiente
- 9- Lavar em Tampão lavagem, 3x2 mins
- 10- Colorir com o cromogeneo (DAB)
- 11- Coloração nuclear com Hematoxilina
- 12- Lavar em água da torneira
- 13- Desidratação e diafanização
- 14- Montagem